

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO-
OCHOA (CSIC-UAM)

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



CARACTERIZACIÓN Y RESCATE DE LAS ANOMALÍAS EN
ESPINAS DENDRÍTICAS EN UN MODELO MURINO PARA
LA ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO A

ANA ISABEL ARROYO TEJEDOR

MADRID 2014

Memoria de Investigación presentada por:

ANA ISABEL ARROYO TEJEDOR
para optar al

GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS POR LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Trabajo dirigido por la Dra. MARIA DOLORES
LEDESMA MUÑOZ (CSIC-UAM)

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Dra. Maria Dolores Ledesma Muñoz, en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Desde Septiembre de 2009 hasta Septiembre de 2013, financiado con una beca/contrato FPI del MICINN.

A Mari Tere

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible”.

Ray Bradbury, escritor estadounidense (1920-2012).

AGRADECIMIENTOS

Al hacer recopilatorio de estos años me vienen a la mente mil momentos y una mezcla de sentimientos y recuerdos sobre los días de trabajo durante esta tesis. Todos los Western Blots, cultivos celulares, las tardes con los animalillos y las cuantificaciones más o menos satisfactorias...Pero lo que está claro es que he sido muy afortunada por haber tenido a tan buena gente a mi alrededor. El balance final tan positivo no lo sería tanto sin vosotros y no podría haber hecho una milésima parte de esto sin contar con vuestra ayuda, así que es el momento de agradeceréoslo mucho.

En primer lugar a mi “familia científica”, porque el CBM ha sido como una segunda casa para mí. Muchas gracias a Lola, por la ayuda que me ha prestado en este tiempo, por su implicación, comprensión y ánimos después de cada buen o mal resultado, por su manera de pensar y hacer ciencia. En el laboratorio siempre sentí su confianza en mí y en el trabajo que hacíamos. Gracias también por la paciencia en las idas y venidas de mails durante la escritura!. Me alegro mucho de haber empezado y terminado esta etapa en tu laboratorio y espero poder aplicar en el futuro lo que he aprendido bajo tu dirección. Muchas gracias también a Carlos, por su buenas ideas y buen humor.

A mis compañeros del 122, ¡porque no he podido tenerlos mejores!. Compartir el tiempo de trabajo con vosotros ha sido un verdadero placer, por el estupendo ambiente que sabéis proporcionar. A Irene, por estar ahí desde el principio cuando empezábamos a llenar el labo comprando cosas o cogiéndolas de donde fuese!, por su cariño y simpatía. A Isabela, por hacernos funcionar en orden aunque intentemos revelarnos, ya nos tienes controlados!. A las chicas que pasaron por el 122, Silvia, María, Laura y Bea, por ser unos soletes, listas y buenísimas compañeras, aunque no estemos en contacto tanto como me gustaría, os deseo lo mejor. A Inés y Rubén, por echarnos una mano siempre con una sonrisa en la cara. A Carol por su vitalidad, ganas contagiosas de trabajar en esto y por las historias que nos contábamos. A Adri porque es un majo y super trabajador, estoy segura de que te irá muy bien en la tesis. A Ernest, por ser 100% natural, a parte de un currante, gracias por tu paciencia, tus consejos en el labo y por tus chistes malos!. A Stefano, porque ha sido mi mejor flatmate, por nuestras pelis de cocodrilos asesinos en el piso y nuestras conversaciones, sabes que valoro mucho tus consejos, tanto los de ciencia como los de vida. A Enrique, por las tardes que hemos pasado trabajando mientras escuchábamos la Excepción y alabábamos a “El Langui”...gracias por ser tan buen compi y por encontrar siempre alternativas cuando la cosa se complicaba. A Isa, por su espontaneidad y por transmitir su buena energía y esfuerzo en el trabajo del lab. A Anna, por su inteligencia y “savoir faire”. A Mauricio, por todo lo que nos hemos reído hasta llorar en las comidas y cenas del lab, por sus buenos consejos y porque con él los problemas parecían más fáciles, te echo de menos amigo!. A Azu, por su ayuda, constancia y esfuerzo, por todos los buenos ratos que hemos pasado juntas en el animalario, por los destetes eternos!. Por muchos ratos también fuera del CBM, mil consejos y algún

que otro viaje, porque siempre se perfecciona en lo que hace y cada día es mejor, tengo mucho que agradecerle!. A Steffi, por las horas que hemos echado en el lab y porque aunque hubiera mucho trabajo, nos lo pasábamos muy bien. Por miles de fotos, bromas, risas y viajes, por descubrirme la huerta murciana!, por tantas noches con las chicas, porque es de las personas más positivas que conozco y tiene un corazón de oro. Si algo me alegra después de todo es haberos conocido, os quiero mucho!.

Fuera del 122 también quiero agradecerle su ayuda a la gente del animalario, M. Eugenia y Marta, por su buen trabajo, por estar siempre dispuestas a echar un cable cuando pedíamos algo excepcional, por su paciencia y simpatía. A Maite y Milagros del servicio de microscopía electrónica, por ser tan trabajadoras y por aguantarme durante horas mientras medía PSDs. A Vero y Maite del SMOC, por explicarme mil veces el funcionamiento de sus confocales, por las fotos bonitas de cerebelo.

A las chicas del lab de J.A. Esteban, por los congresos en Oviedo y Barcelona, por los consejos e infinitos reactivos prestados.

A la gente del laboratorio de J. Ávila, por ser tan amables y siempre dispuestos a ayudar con lo que he necesitado.

A mis compañeros “moscólogos”, por su buena acogida cuando llegué al CBM, María, Ana, y Javier.

A muchos otros compañeros que encontraba por los pasillos y a un montón de gente que ya dejó el centro, Muchas Gracias!.

A mi familia, porque me han dado todo y gracias a ellos he podido llegar hasta aquí. A mi padre, porque aunque no se cansará de decirme que elegí “ la carrera del hambre” sé que está orgulloso de mí y que se le caerá la baba el día que presente esto. Siempre me ha transmitido su constancia y esfuerzo en el trabajo, y aunque no sé si sabré hacerlo tan bien como él, claramente es mi ejemplo a seguir. A mi madre, porque es la mejor, me ayuda incondicionalmente y porque cuento con sus ánimos, cariño y comprensión, sean cuales sean mis decisiones. A mi hermano, porque no conozco a nadie que me haga reír como él, porque es un auténtico luchador y no hay quién le pare. Aunque estés lejos y te eche de menos, sé que estás feliz y que conseguirás ser quien quieres ser, eso si que es admirable Dani!. No hay palabras para escribir lo que os quiero!.

A mis abuelas, porque son las más majas y llevan cuatro años esperando a que invente la fórmula anti-dolor de rodillas y otras molestias...Lo siento abuelitas, me perdí con la Esfingomielina!

A mis tíos y primos, que siempre me preguntan y se preocupan sobre el parto de la tesis.

A mi abuelo, porque allí donde esté, estará orgulloso de su nieta. Tu me manques!.

A mi tía Tere, porque aunque no esté con nosotros, pienso en lo mucho que podríamos haber compartido estos años, cómo habríamos ido cambiando juntas y lo que habríamos reído!. Siempre vas a estar en mi corazón.

A mis amigos, porque ellos me han animado siempre, desde la carrera, durante el doctorado y mucho más ahora en esta etapa final. A Miriam, por ser como una hermana y porque cree en mí más que yo misma. Por hablar con ella sin que importe la hora del día o de la noche, por nuestros viajes con penurias incluídas, porque llevamos muchos años mano a mano y espero que sean muchísimos más, te quiero mucho!. A Yohei, por ser un artistazo y compartir conmigo sus temas, por las cenas tan ricas que cocina y por ayudarme con el InDesign. A David, por llamarme cuqui, por su cariño, por las conversaciones sobre nuestros descubrimientos musicales, por su arte making beats! y por todo lo que aprendo gracias a él. A Haleh, por nuestras charletas dentro y fuera del CBM, sus ánimos, nuestras cañas divertidas en Malasaña, porque me trata muy bien y porque siempre me esperaba para volver a la renfe. A Sarah y Josh por haber aparecido de repente y darme muchos consejos, por ser tan buenos músicos y por nuestra afición al running, espero que corramos muchos más km juntos!. A Alba, por su frescura y cariño, por compartir tantos secretos conmigo y por estar ahí siempre desde que la conocí. A Candice, Elodie y Pilar, porque aunque estén fuera sigo sintiéndolas muy cerca, porque son unas luchadoras y son admirables. A Ruby, por tratarme tan bien siempre, por los meses que hemos vivido en el pisito y por sus lentejas. A Cas, por todo el amor que me ha dado desde que le conocí, por nuestros bailes en Siroco, nuestras bromas, motes y trap! por su esfuerzo y dedicación en lo que hace, por ser tan grande, Much Love!.

Espero que las próximas etapas me dejen tan buen recuerdo como ésta que acaba.
MUCHAS GRACIAS A TODOS!!!

ÍNDICE

	PÁGINA
Abreviaturas	27
I. RESUMEN/ ABSTRACT	37
II. INTRODUCCIÓN	43
1. LAS ESPINAS DENDRÍTICAS	44
1.1 Morfología de las espinas dendríticas.	44
1.2 Dinamismo de las espinas dendríticas.	45
2. RELACIÓN ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA	46
2.1 Interacción entre proteínas unidoras de actina y membrana plasmática.	46
3. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LAS ESPINAS DENDRÍTICAS	48
3.1 Rho GTPasas.	49
3.1.1 Ciclo funcional de las Rho GTPasas.	50
3.1.2 RhoA.	51
3.2 Efectores de RhoA en espinas dendríticas: ROCK II y Profilina IIa.	52
3.2.1 ROCK II	52
3.2.2 Profilina	52
3.3 Unión de RhoA a la membrana sináptica: papel de los mGluRs.	53
4. LÍPIDOS Y ESPINAS DENDRÍTICAS	54
4.1 Balsas lipídicas o rafts.	56

5. ESFINGOMIELINA, ESFINGOMIELINASAS Y ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO-A.	58
5.1 La Esfingomielinasa Neutral (NSM2).	59
5.2 La Esfingomielinasa Ácida (ASM).	60
5.3 La Enfermedad de Niemann Pick (NPD) Tipo A.	60
III. OBJETIVOS	67
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	71
Anticuerpos y Marcadores	71
1. RATONES	72
1.1 Descripción y mantenimiento.	72
1.2 Genotipado.	72
2. CULTIVO CELULARES PRIMARIOS	73
2.1 Neuronas Hipocampales.	73
2.2. Astrocitos Corticales.	74
3. MICROSCOPIA	74
3.1 Microscopía electrónica de transmisión.	74
3.2 Microscopía de fluorescencia.	75
3.2.1 Marcaje con Lisenina.	75
3.2.2 Análisis de proteínas y F-actina.	75
3.2.3 Análisis de la muerte neuronal.	76
4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR	76
4.1 Extractos totales de cerebro.	76
4.2 Aislamiento de sinaptosomas	77
4.2.1 Aislamiento de la fracción post-sináptica (PSD)	77
4.2.2 Obtención de fracciones de membrana y citosólicas.	78
4.2.3 Aislamiento de rafts lipídicos.	78

	PÁGINA
5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	78
5.1. Precipitación de proteínas	78
5.1.1 Ácido Tricloro Acético (TCA)-Etanol.	78
5.1.2 Metanol-Cloroformo (MeOH-CHCl ₃).	79
5.2 Medida de la concentración de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA).	79
5.3 Electroforesis de proteínas e Inmunodetección por Western Blot (WB).	79
5.4 Inmunoprecipitación	80
6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NSM2.	81
7. ANÁLISIS DE LÍPIDOS: CUANTIFICACIÓN DE SM MEDIANTE ENSAYO ENZIMÁTICO.	82
8. TRATAMIENTOS EN SINAPTOSOMAS	83
8.1 Estimulación con KCl 55mM.	83
8.2 Adición de SM y tratamiento con SMasa exógena.	83
8.3 Tratamientos con 1 α , 25-dihidroxitamina D ₃ y Dexametasona.	83
8.4 Tratamientos con antiinflamatorios no esteroideos (AINE).	84
9. TRATAMIENTOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES.	84
9.1 Tratamientos con SM y SMasa exógenas.	84
9.2 Tratamientos con 1 α , 25-dihidroxitamina D ₃ y Dexametasona.	84
10. TRATAMIENTOS ORALES CON DEXAMETASONA E IBUPROFENO.	85
11. TESTS DE COMPORTAMIENTO.	85
11.1 Y-Maze	86

	PÁGINA
11.2 Polo Vertical.	86
12. MEDIDA DEL mRNA DE NSM2.	86
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	87
V. RESULTADOS	91
1. La ausencia de ASM provoca una reducción en el número y tamaño de las espinas dendríticas.	91
2. La ausencia de ASM disminuye la cantidad de actina polimerizada en espinas dendríticas debido a la acumulación de SM.	93
3. El aumento de SM reduce la unión a la membrana y la actividad de RhoA y sus proteínas efectoras en sinaptosomas de ratones ASM-/-.	97
4. Los niveles de mGluR1/5 y su interacción con RhoA están reducidos en los sinaptosomas ASM-/-.	102
5. La reducción de los niveles de SM mediante la activación de NSM restablece in vitro el anclaje de RhoA a la membrana y los niveles de F-actina en las sinapsis ASM-/-.	105
6. La administración oral de DM recupera las anomalías en SMy RhoA en sinapsis, incrementa el tamaño de las espinas dendríticas, previene la muerte neuronal y mejora déficits de comportamiento en ratones ASM-/-.	109
VI. DISCUSIÓN	119
1. Influencia de la SM en el citoesqueleto de actina de las espinas dendríticas.	119
2. Causas de la deficiente activación de RhoA en espinas dendríticas carentes de ASM.	120
3. Consecuencias de la carencia de ASM en la vía de señalización de RhoA en espinas dendríticas.	122

	PÁGINA
4. Relevancia sináptica de la ASM, una enzima principalmente lisosomal.	123
5. Efectos de la activación de la NSM2 en las sinapsis carentes de ASM.	124
6. Mecanismo de acción de la DM .	125
7. Papel fisiológico y patológico de la SM en las espinas dendríticas	127
VII. CONCLUSIONES	131
VIII. BIBLIOGRAFÍA	135
IX. ANEXO	163
ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura I1. Clasificación morfológica general de las espinas dendríticas.	45
Figura I2: Representación esquemática de los diferentes modos de interacción ABPs-MP	46
Figura I3. Proteínas involucradas en el control del citoesqueleto de actina de las espinas dendríticas.	48
Figura I4: Principales vías de señalización entre las RhoGTPsas y el citoesqueleto de actina en neuronas.	49
Figura I5: Ciclo de activación e inactivación de las RhoGTPasas	50
Figura I6: Diferentes estados de los rafts lipídicos.	57
Figura I7: Fenotipo de los ratones ASM-/-.	61
Figura I8: Los cerebros ASM-/- presentan menor número de espinas en el S1 de la corteza y una tendencia a ésta reducción en el CA1 hipocampal.	63
Figura M1: Estructura genómica del gen ASM y estructura del alelo tras la recombinación homóloga.	72

Figura M2: Esquema representativo de las reacciones enzimáticas para la determinación de la actividad de la NSM.	82
Figura R1A: Menor tamaño de las espinas dendríticas de neuronas del CA1 hipocampal en cerebros de ratones ASM-/- .	91
Figura R1B: Menor tamaño de las espinas dendríticas de células de Purkinje del cerebelo en ratones ASM-/- .	92
Figura R2A: Las espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo derivadas de ratones ASM-/- presentan bajos niveles de F-actina.	93
Figura R2B: Las membranas postsinápticas de neuronas ASM-/- presentan altos niveles de SM.	94
Figura R2C: Aumento de los niveles de SM en la membrana de neuronas hipocampales ASM+/+ en cultivo tras incubación con SM exógena.	95
Figura R2D: La modulación de los niveles de SM afecta a la cantidad de F-actina en espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo.	96
Figura R3A: La cantidad total y unida a membrana de cdc42 y Rac1 no está alterada en sinaptosomas ASM-/-.	97
Figura R3B: La cantidad total y unida a membrana de RhoA está disminuida en sinaptosomas ASM-/-.	98
Figura R3C: La actividad de RhoA está reducida en sinaptosomas ASM-/-.	99
Figura R3D: La cantidad de los efectores de RhoA, ROCK y PIIa, está reducida en sinaptosomas ASM-/-.	100
Figura R3E: El incremento de SM en sinaptosomas ASM+/+ reduce la unión a membrana de RhoA y sus efectores, ROCKII y PIIa.	101
Figura R3F: El tratamiento de sinaptosomas ASM-/- con SMasa reduce los niveles de SM y restablece la unión a la membrana de RhoA.	101
Figura R4A: Los niveles de mGluR1 y mGluR5 están reducidos en sinaptosomas de ratones ASM-/- debido al incremento de SM.	102

Figura R4B: La interacción entre mGluR1 y mGluR5 con RhoA está disminuida en sinaptosomas de ratones ASM-/-.	103
Figura R4C: La actividad de RhoA no se incrementa en respuesta a estímulo en sinaptosomas ASM-/-.	104
Figura R5A: La NSM2 está presente en cantidades similares en sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/-.	105
Figura R5B : Los tratamientos con VitD ₃ y DM disminuyen la cantidad de SM en sinaptosomas de ratones ASM-/-.	106
Figura R5C : El tratamiento con DM aumenta los niveles de proteína de la NSM y su actividad en sinaptosomas de ratones ASM-/-.	106
Figura R5D: Los tratamientos con VitD ₃ y DM aumentan la unión a membrana de RhoA en sinaptosomas de ratones ASM-/-.	107
Figura R5E: Los tratamientos con VitD ₃ y DM aumentan la cantidad de F-actina en espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo de ratones ASM-/-.	107
Figura R5F: Los tratamientos con VitD ₃ y DM carecen de efectos significativos en sinaptosomas y neuronas hipocamaples en cultivo derivados de ratones ASM+/+.	108
Figura R6A: El tratamiento oral con DM no altera los niveles de SM ni el anclaje de RhoA a la membrana sináptica en ratones ASM+/+.	110
Figura R6B: El tratamiento oral con DM en los machos ASM-/- no altera de manera significativa los niveles de SM, la expresión de NSM ni el anclaje de RhoA a la membrana sináptica.	111
Figura R6C: El tratamiento oral con DM disminuye los niveles de SM, aumenta los niveles proteicos y de mRNA de NSM y la unión de RhoA a la membrana sináptica en hembras ASM-/-.	111

Figura R6D: El tratamiento oral con Dexametasona incrementa el tamaño de las espinas dendríticas en el hipocampo de hembras ASM-/-.	112
Figura R6E: El tratamiento oral con DM previene la degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo de las hembras ASM-/-.	113
Figura R6F: El tratamiento oral con DM mejora la memoria espacial en hembras ASM-/-.	114
Figura R6G : El tratamiento oral con DM mejora la coordinación motora en hembras ASM-/-.	115
Figura D1: Menor presencia de RhoA en rafts lipídicos en sinaptosomas de ratones ASM-/-.	121
Figura D2: Los tratamientos in vitro e in vivo con Ibuprofeno no producen efecto significativo en los niveles de SM y unión de RhoA en la membrana sináptica de ratones ASM-/-.	127
Figura D3: Modelo para la función de la SM y sus enzimas catabólicas en espinas dendríticas.	128
Tabla M1: Anticuerpos primarios.	71
Tabla M2: Anticuerpos secundarios.	71
Tabla M3: Reconocimiento de otros marcadores.	71

ABREVIATURAS

- ABPs: Actin Binding Proteins
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ADHP: 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine
- ADP: Adenosine diphosphate
- AINEs: antiinflamatorios no esteroideos
- AMPARs: Receptores de glutamato de tipo AMPA (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl 4-isoxazolepropanoic acid)
- APLs: Anionic phospholipids
- Arp2/3: Actin related protein 2/3
- ASM: Acid Sphingomyelinase / Esfingomielinasa Ácida
- ASM+/+: ratones silvestres (Wt)
- ASM-/- : ratones deficientes en ASM
- BCA: Bicinchoninic Acid
- BSA: Bovine serum albumin
- CA1: Cornu Ammonis area 1
- CaN: Calcineurina
- Cdc42: Cell-division cycle 42
- Cdk5: cyclin-dependent kinase 5
- Cer: Ceramida
- CRAC: Cholesterol recognition aminoacid consensus
- COX: Choline Oxidase (from alcaligenes sp.)

- Cyp46: cholesterol 24-hydroxylase
- DAG: Diacilglicerol
- DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DHPG: (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine
- DIV: Días *in vitro*
- DM: Dexametasona
- DMEM: Dubecco's modified Eagle's Medium
- DMSO: Dimetil Sulfóxido
- DNaseI: Deoxyribonuclease I
- DRMs: Detergent resistant membranes
- E "X": día embrionario "X"
- ECL: enhanced chemiluminescence detection system
- EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
- EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid
- Ena/VASP: Enabled/Vasodilator-stimulated phosphoprotein
- EGFR: epidermal growth factor receptor
- ER: Endoplasmic reticulum
- ERM: ezrin/radixin/moesin
- EtOH: Etanol
- F-actina: filamentos de actina/ actina polimerizada
- Fal: Faloidina

- FAN: Factor associated with neutral sphingomyelinase activation
- FBS: Fetal Bovine Serum
- g : fuerza x gravedad
- G-actina: actina globular/ actina monomérica
- GAP: GTPase- activating protein
- GAPDH: Glyceraldehyde-3-dehydrogenase gene
- GC: Glucocorticoids
- GCRs: Glucocorticoid Receptors
- GDI: Guanine-Nucleotide Dissociation Inhibitor
- GDP: Guanosine diphosphate
- GEF: Guanine-Nucleotide Exchange Factor
- GluR1: Glutamate receptor 1 (AMPA subunit)
- GPI: Glycophosphatidylinositol
- GRIP: GluR-interacting protein
- GRKs: quinasas de receptores acoplados a proteínas G
- GSLs: Glicosfingolípidos
- GTP: guanosín trifosfato
- GUSB: Glucuronidase β gene
- HBSS: Hanks Buffer Salt Solution
- HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA

- HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene
- HRP: Horse Raddish Peroxidase
- HVA: Homovanilic Acid
- IC: Inmunocitoquímica
- IH: Inmunohistoquímica
- IP: Inmunoprecipitación
- IL-1 β : Interleuquina-1 β
- LDLs: Low density lipoproteins
- LTD: Long Term Depression/ Depresión a largo plazo
- LTP: Long Term Potentiation/ Potenciación a largo plazo
- LPS1: Fosfoproteína específica de linfocitos
- mRNA: messenger Ribonucleic acid
- MAP2: Microtubule associated protein 2
- MAPK-ERK: Mitogen-activated protein kinase-extracellular signal regulated kinase
- mDia: mammalian diaphanous
- MEM: Minimum Essential Media
- mGluRsl: Type I metabotropic Glutamate Receptors
- MLCK: myosin light chain kinase
- MP: membrana plasmática
- MRLC: myosin II regulatory light chain
- MeOH: Metanol

- Myo II: myosin II
- NB27: neurobasal medium B27 supplemented
- NMDARs: receptores de glutamato tipo NMDA (N-methyl-D-aspartic acid)
- NOS: Nitric oxide synthase
- NPA: Niemann Pick Type A
- NPB: Niemann Pick Type B
- NPCs: Neural progenitor cells
- NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug
- NSM2: Neutral Sphingomyelinase 2/ Esfingomielinasa Neutral 2
- N-WASP: neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
- P: pellets/ fracción de membrana
- P "X": día postnatal "X"
- p35: the essential subunit of Cdk5
- p42POP: 42KDa partner of profilin
- PA: Phosphatase Alcaline
- Pak: p21-activated protein kinase
- PIIa: Profilina IIa
- PBS: Phosphate buffer saline
- PBST: Phosphate buffer saline Tween 20- 0,1%
- PC: Fosfatidilcolina

- PCho: Fosfocolina
- PCR: Polymerase chain reaction
- PE: Fosfatidiletanolamina
- PI: Fosfatidilinositol
- PIPs: Phosphoinositides
- PIP_2 : fosfoinositol (4, 5) bifosfato
- PI3K: phosphoinositide 3 kinase PKA
- PIP_3 : fosfatidilinositol (3, 4, 5) trifosfato
- PKC: Protein kinase C
- PKC δ : Protein kinase C δ
- PFA: Paraformaldehído
- PFA-SEM: Paraformaldehído-(Sacarosa-EGTA-MgCl₂)
- PLC: Fosfolipasa C
- PLPs: Poli-L-prolina
- PLL: Poli-L-Lysine hydrobromide
- POD: Peroxidase from Horseradish
- PS: Fosfatidilserina
- PSD: Postsynaptic Density/ Densidad postsináptica
- Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate
- RACK1: Receptor for activated C kinase 1
- RhoA: Ras-homolog gene family member A

- RNA: Ribonucleic acid
- RNasa: Ribonucleasa
- ROCK: Rho associated coiled-coil-containing protein kinase
- RPM: revoluciones por minuto
- RT-PCR: Real Time- PCR
- S: supernatant/ fracción citosólica
- S1/L1: Somatosensory cortex/ Layer 1
- S1P: Esfingosina-1-fosfato
- SDS: Dodecilsulfato Sódico
- Se: Sphingosine/ Esfingosina
- SLs: Sphingolipids/ Esfingolípidos
- SIN: sinaptosomas
- SM: Sphingomyelin/ Esfingomielina
- SMAse: Esfingomielinasa
- SNARE: Soluble (N-thylmaleimide sensitive fusion) attachment protein receptor
- SNC: Sistema nervioso central
- SPMD3: sphingomyelin phosphodiesterase, Neutral Membrane
- SPMD1: sphingomyelin phosphodiesterase, Acid Lysosomal
- Src: Tirosina quinasas
- Sy38: Sinaptofisina (clon 38)
- TCA: Trichloroacetic Acid

- TNF α : Tumor necrosis factor α
- TRITC: Tetrametilrodamina
- u.a.: unidades arbitrarias
- VCP: Valosin containing protein
- VitD₃ : Vitamina D₃
- WB: Western Blot
- WIP: WASP-interacting protein

RESUMEN

Las espinas dendríticas son protrusiones de la membrana neuronal que reciben la mayor parte del estímulo excitatorio en el Sistema Nervioso Central. Los cambios en la forma, el tamaño o el número de espinas son esenciales en los procesos de aprendizaje y memoria. El citoesqueleto de actina, especialmente enriquecido en estas estructuras, es un elemento clave en la regulación de este dinamismo que debe acompañarse de la remodelación de la membrana postsináptica. Sin embargo, se conoce poco sobre la relación dinámica entre la actina y los principales componentes de la membrana, los lípidos. En este trabajo de tesis identificamos a la Esfingomielina (SM), como un modulador clave del citoesqueleto de actina en espinas. Empleando ratones deficientes en la esfingomielinasa ácida (ASM^{-/-}), que mimetizan la enfermedad de Niemann Pick tipo A (NPA), demostramos que los niveles elevados de SM en la membrana postsináptica producen una reducción en el tamaño de las espinas y en su contenido en actina filamentosa. En el mecanismo molecular implicado, el incremento del lípido reduce los niveles de los receptores metabotrópicos de glutamato de tipo I (mGluR1/5), impidiendo la unión a la membrana y activación de proteínas estabilizadoras de los filamentos de actina como RhoA y sus efectores ROCK y ProfilinII. La activación farmacológica de la esfingomielinasa neutral (NSM) previene los fenotipos alterados en espinas *in vitro* e *in vivo*, así como evita la neurodegeneración y mejora las deficiencias motoras y de memoria en ratones ASM^{-/-}. Estos resultados muestran la influencia del esfingolípido más abundante en las membranas neuronales, la SM, y de sus enzimas catabólicas en la fisiología de espinas dendríticas. Además, contribuyen a entender la patología de la NPA abriendo perspectivas para su tratamiento.

Dendritic spines are protrusions of the neuronal membrane that receive most of the excitatory input in the Central Nervous System. Changes in the shape, size and number of spines underlie memory and learning processes. The actin cytoskeleton, which is enriched in these structures, is a key regulator of spine dynamism that must be accompanied by the remodelling of the postsynaptic membrane. However, little is known about the link between the actin cytoskeleton and the membrane major components: the lipids. This PhD thesis work identifies sphingomyelin (SM) as a key modulator of the dendritic spine actin cytoskeleton. We show that increased SM levels in neurons of acid sphingomyelinase knock out mice (ASM^{-/-}), which mimic Niemann Pick disease type A (NPA), result in reduced spine size and low levels of filamentous actin. Mechanistically, SM accumulation decreases the levels of metabotropic glutamate receptors type I (mGluR1/5) at the synaptic membrane impairing membrane attachment and activity of the filamentous actin stabilizing proteins RhoA and its effectors ROCK and ProfilinIIa. Pharmacological enhancement of the neutral sphingomyelinase (NSM) rescues the spine molecular and morphological phenotypes in vitro and in vivo, prevents neuronal degeneration and improves motor and memory deficits in ASM^{-/-} mice. Altogether, these data demonstrate the influence of the most abundant sphingolipid in neuronal membranes, SM, and of its catabolic enzymes in dendritic spine physiology. They also contribute to understand NPA pathology opening new perspectives for therapeutic interventions.

INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo, Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) sentó las bases de la neurobiología moderna al demostrar que el tejido nervioso no era una red continua como se creía hasta entonces. En efecto, el cerebro de mamíferos se constituye de una enorme diversidad de tipos celulares conectados entre sí mediante circuitos complejos.

Esta elaboración, estructural y funcional, permite la integración, procesamiento y almacenamiento de la información, así como la ejecución de diferentes respuestas biológicas en respuesta a esta información. Una de las claves de la gran complejidad estructural del sistema nervioso central (SNC) es la diversidad de tipos celulares, neuronales y gliales, presentes en el mismo (Thivierge, 2008). La gran variedad de tipos neuronales se clasifican en base a su morfología, contenido de neurotransmisores, expresión de proteínas específicas, tipos de sinapsis y comportamiento de disparo o firing (Masland, 2004).

Gracias a las propiedades eléctricas de la membrana plasmática (MP), las neuronas son capaces de generar, integrar y propagar señales eléctricas estableciendo contactos funcionales denominados sinapsis. Mediante la liberación de neurotransmisores las sinapsis químicas regulan la comunicación eléctrica de la red neuronal, transmitiendo información desde las terminales axónicas hacia regiones dendríticas postsinápticas. Las respuestas de la red neuronal han de ser precisamente controladas para asegurar una correcta actividad cerebral. Así, el sistema nervioso es capaz de variar la eficacia de la transmisión del mensaje nervioso a través de las conexiones sinápticas como respuesta a los estímulos durante el desarrollo y la vida adulta, modificando la fuerza de las sinapsis a corto o a largo plazo y con ello las estructuras y circuitos neuronales. Estas modificaciones constituyen un fenómeno característico y esencial de la red neuronal conocido como plasticidad sináptica y considerado la base de la codificación y almacenaje de memoria y aprendizaje, así como de los procesos relacionados con la consciencia, inteligencia y comportamiento (Martin et al., 2000; Chen et al., 2007).

Gran cantidad de evidencias apoyan la hipótesis de que los cambios a medio y largo plazo en la eficacia de las sinapsis forman la base de los procesos de aprendizaje y memoria (Holmaat & Svoboda, 2009). Dos de los fenómenos más estudiados de la plasticidad sináptica son la llamada potenciación duradera o LTP (Long Term Potentiation) y depresión duradera o LTD (Long Term Depression). Ambos mecanismos se basan en la dinámica de receptores de Glutamato de la región postsináptica, encargados de detectar la presencia de Glutamato liberado por las terminales presinápticas e integrar la información en forma de vía de señalización en el lumen dendrítico. Las regiones dendríticas con mayor concentración de receptores de Glutamato se conocen como espinas dendríticas, susceptibles de una remodelación constante.

1. LAS ESPINAS DENDRÍTICAS

Las espinas dendríticas constituyen el principal lugar de procesamiento y almacenaje de información en el cerebro, considerándose la base morfológica de la plasticidad sináptica (Yuste & Bonhoeffer, 2001; Yuste & Tank, 1996). Son protusiones altamente especializadas de la membrana postsináptica que brotan del eje dendrítico y reciben la mayoría de sinapsis excitatorias del cerebro de mamíferos (Harris & Kater 1994, Bourne & Harris, 2008), siendo modificables por la actividad y la experiencia. Las espinas dendríticas proporcionan un micro-compartimento en el que se generen las respuestas postsinápticas. Pueden funcionar como compartimentos semi-autónomos, ya que están separadas del eje dendrítico por un cuello que puede regular la difusión de iones y otras moléculas especializadas. Así, unas de sus funciones principales es la compartimentalización de iones Ca^{2+} formando reservorios bioquímicos, además de ser capaces de filtrar potenciales de membrana (Araya et al., 2006), por lo que crean un sistema coordinado que aísla unos impulsos sinápticos de otros (Yuste & Denk, 1995; Koch & Zador, 1993).

1.1 Morfología de las espinas dendríticas

Las espinas dendríticas son estructuras heterogéneas en tamaño (con una longitud de entre $0.5\text{-}2\ \mu\text{m}$) y en densidad (variando desde 1 a 10 espinas por μm de dendrita). Formadas por una cabeza esférica y un cuello estrecho (Harris & Stevens, 1989; Noguchi et al., 2005), pueden además variar su morfología de manera transitoria en unos pocos segundos o minutos o por el contrario sufrir cambios duraderos en el tiempo (Matus, 2005). La clasificación según la morfología de espinas comúnmente aceptada establece tres grupos principales: a) gruesa y corta (stubby), b) en forma de champiñón y de cabeza grande (mushroom) y c) filopodial o fina y de cabeza pequeña (thin) (**Figural1**).

Existe una relación entre la morfología de la cabeza de la espina y su funcionalidad debida, en parte, a los niveles de receptores de glutamato de tipo AMPA (AMPArs) (Kasai et al., 2003). Así, las espinas pequeñas, consideradas también como espinas inmaduras, son más dinámicas y tienen una mayor capacidad de respuesta a estímulos, siendo más susceptibles a fenómenos de LTP (Tada & Sheng, 2006). Las espinas de mayor tamaño se consideran más estables y menos plásticas (espinas maduras o de memoria) (Matsuzaki, 2007).

De acuerdo con esto, la funcionalidad de las espinas está determinada por su morfología. De hecho, muchos síndromes que causan retardo mental y trastornos cognitivos presentan alteraciones en la morfología, tamaño o densidad de las espinas dendríticas (Kaufmann et al., 2000). Un factor regulador clave de la morfología de espinas dendríticas es el citoesqueleto de actina muy enriquecido en estas estructuras.

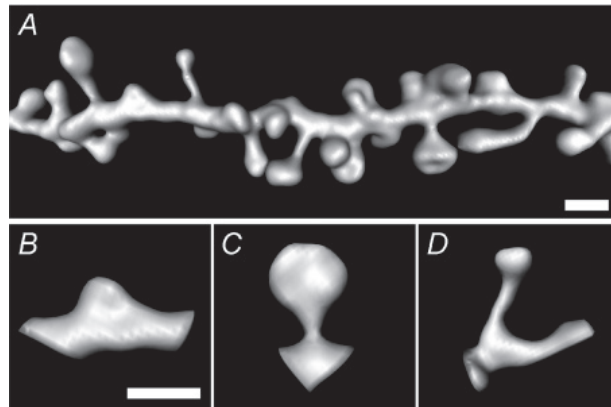


Figura 11. Clasificación morfológica general de las espinas dendríticas. **A.** Imagen de la reconstrucción en 3D de un segmento dendrítico de una neurona piramidal del CA1 en ratón expresando la proteína verde fluorescente. Las espinas se pueden clasificar en 3 tipos generales: **B.** cortas y gruesas (stubby, < 0,5 μm de longitud). **C.** tipo champiñón o de cabeza grande (mushroom) y **D.** finas y largas con cabeza pequeña (thin). Barra de escala 1 μm . (Imagen tomada de McKinney, 2010).

Está constituido por actina filamentosa (F-actina) (Furuyashiki et al., 2002; Matus et al., 1982; Fisher et al., 1998) compuesta a su vez por actina monomérica o globular (G-actina) que polimeriza en filamentos con un índice de recambio constante en el tiempo de un minuto aproximadamente (Star et al., 2002). Este proceso requiere de la polimerización desde un extremo (+) y despolimerización en el opuesto (-). En las espinas existen diferentes puntos enriquecidos en F-actina, como son, un reservorio dinámico en la punta de la espina que genera una fuerza expansiva, un reservorio estable en la base, cuyo tamaño depende del volumen de la espina y un tercer punto confinado al cuello que está regulado por Ca^{2+} y proporciona un agrandamiento del tamaño de la espina persistente durante largo tiempo (Honkura et al., 2008).

1.2 Dinamismo de las espinas dendríticas.

La información en el cerebro puede ser almacenada mediante el reforzamiento o debilitación de las sinapsis existentes, lo que se traduce en cambios en el tamaño y/o la morfología e incluso en la aparición o eliminación de las espinas dendríticas en respuesta a eventos de señalización externos (Bonhoeffer & Yuste, 2002; Nimchinsky et al., 2002). El mecanismo común subyacente a estos fenómenos se basa en el dinamismo de la actina local (Kasai et al., 2003; Yuste & Bonhoeffer 2001). Por ello, los factores que regulan este proceso de polimerización-despolimerización constituyen la clave para adaptar la respuesta sináptica al estímulo recibido (Alvarez & Sabatini, 2007; Holtmaat & Svoboda, 2009; Matus, 2005).

Por otro lado, hay que destacar que las espinas dendríticas son protrusiones de la membrana postsináptica. La remodelación en respuesta a estímulo de la membrana, cuyos principales componentes son los lípidos, es tan notable como los cambios en el

citoesqueleto de actina y constituye asimismo un factor clave en los procesos dinámicos de reorganización de estas estructuras (Carlisle & Kennedy, 2005).

Numerosos estudios dedicados a caracterizar la maquinaria proteica tratan de explicar los mecanismos que aúnan la actividad sináptica con la dinámica de actina. La participación de los lípidos es un campo mucho menos explorado pero las evidencias indican que el citoesqueleto de actina y la membrana constituyen un sistema que actúa de manera sinérgica en la sinapsis. En esta tesis doctoral se han caracterizado mecanismos moleculares que controlan dicha cooperación. A continuación describimos diferentes evidencias que relacionan el citoesqueleto de actina y la MP.

2. RELACIÓN ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La relación del citoesqueleto de actina con la MP es bidireccional. Por un lado, la membrana requiere del impulso de los filamentos de actina para modificar su curvatura en procesos como la migración, formación de protrusiones o cambios en la morfología en respuesta a estímulos. Por otro lado, la correcta localización y actividad de diversas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina depende de su unión a la MP.

Existe una gran variedad de proteínas unidoras de actina (Actin Binding Proteins, ABPs) capaces de interactuar al mismo tiempo con el córtex de filamentos de actina y con la MP, bien directamente o con ayuda de otras proteínas intermediarias.

2.1 Interacción entre proteínas unidoras de actina y MP.

Existen tres formas diferentes por las cuales las ABPs interactúan con la MP (**Figura I2**): (1) uniéndose a la superficie de la membrana mediante la interacción con lípidos, (2) siendo proteínas integrales de membrana, (3) uniéndose a proteínas que a su vez están asociadas a membrana (Cowin & Burke, 1996; Mangeat et al., 1999).

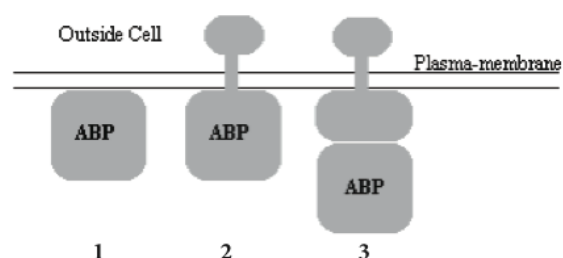


Figura I2: Representación esquemática de los diferentes modos de interacción ABPs-MP. 1. Unión directa a lípidos, 2. ABPs transmembrana, 3. Unión a través de proteínas asociadas a membrana.

1) ABPs que se unen a lípidos: el primer ejemplo descrito fue la profilina, que se une específicamente al fosfatidilinositol (4, 5)-bisfosfato (PIP_2), un fosfolípido altamente cargado localizado en la cara citoplasmática de la MP (Lassing and Lindberg, 1985). Estudios posteriores mostraron que PIP_2 sirve de cofactor para el anclaje de muchas otras ABPs a la MP (Czech, 2000), como es el caso de la familia ezrina-radixina-moesina (ERM) y de la talina (Blin et al., 2008; Heise et al., 1991; Heiska et al., 1998; Hirao et al., 1996; Martel et al., 2001; Zhang et al., 2005). Esta unión no sólo media el anclaje a membrana de las ABPs si no que modula también sus propiedades.

Para unirse directamente a lípidos las ABPs han de sufrir modificaciones postraduccionales que suelen consistir en la adición de residuos derivados del metabolismo de esfingolípidos (SLs) mediante reacciones de miristoilación, prenilación (geranil-geranilación, farnesilación) o palmitoilación (Levental et al., 2010; Magee, 1989; Stokoe et al., 1994; Thelen et al., 1991). Este fenómeno no es exclusivo de las ABPs. Se ha descrito asimismo para otro grupo de proteínas como es el caso de la familia de las Rho GTPasas. Se trata de proteínas citosólicas que bajo determinadas condiciones pueden translocarse a la membrana para su interacción con distintos efectores que afectan de manera directa al citoesqueleto de actina (Bustelo, 2000; Prag et al., 2007; Schmidt and Hall, 2002; Vaughan et al., 2011). Cabe destacar que el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP_3), generado a partir de PIP_2 por acción de la quinasa PI3K (Fosfoinositol-3-quinasa), es un activador de las RhoGTPasas (Bustelo, 2000) que afecta a moléculas nucleadoras de actina (Higgs & Pollard, 2000; Lai et al., 2008; Rozelle et al., 2000) dando lugar a la polimerización y ramificación de los filamentos de actina (Goley & Welch, 2006; Tseng & Wirtz, 2004).

Puesto que las modificaciones postraduccionales anteriormente mencionadas son un requisito necesario para la unión a membrana y activación de ABPs y RhoGTPasas, las perturbaciones en el metabolismo de los SLs podrían llevar a su deslocalización, acarreando defectos en la reorganización del citoesqueleto de actina. Debido a la importancia de este evento en los estudios desarrollados en esta tesis doctoral describiremos más adelante la influencia del metabolismo de SLs en la sinapsis.

2) ABPs como proteínas integrales de membrana: Este tipo de proteínas están embebidas en la MP de modo que contactan directamente con regiones lipídicas. En su parte citoplasmática suelen presentar regiones de homología a los dominios de unión a actina de otras ABPs, conectando así membrana y citoesqueleto. Algunos ejemplos son el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Den Hartigh et al., 1992), la fosfoproteína específica de linfocitos (LPS1), ponticulina, algunas integrinas (Takaishi et al., 2000) y otras proteínas importantes en la función sináptica como β -aducina (Bednarek & Caroni, 2011; Bennett et al., 1988).

3) ABPs que se unen a proteínas asociadas a membrana: Este parece ser el mecanismo más frecuente para conectar ABPs con MP. Como ejemplo podemos mencionar proteínas como la paxilina (Turner, 2000) o talina (Ziegler et al., 2008) y las proteínas ERM, que se unen a glicoproteínas asociadas a membrana como CD44 en presencia de PIP_2 y en un proceso dependiente de la actividad de GTPasas como RhoA (Hirao et al., 1996; Kotani et al., 1997).

3. EL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LAS ESPINAS DENDRÍTICAS

Estudios de microscopía electrónica realizados en neuronas piramidales del prosencéfalo de rata mostraron que la distribución de la F-actina en las espinas dendríticas no es homogénea. Se concentra principalmente en la densidad postsináptica o PSD y en menor grado en regiones subsinápticas y en el cuerpo de la espina (Cohen et al., 1985; Matus et al., 1982). Su estabilidad también es variable. Puede exhibir resistencia durante horas a drogas bloqueantes de la polimerización de actina como las citocalasinas (Allison et al., 1998). Sin embargo, cuando se requiere un estado que implique motilidad, la F-actina puede despolimerizarse muy rápidamente (Fisher et al., 1998). El grado de polimerización de la actina controla la fluidez del desplazamiento de moléculas en la bicapa de la MP de la espina (Renner et al., 2009), como es el caso de los receptores de neurotransmisores o proteínas de andamiaje de la membrana postsináptica (Kuriu et al., 2006; Richards et al., 2004; Kusumi et al., 2005).

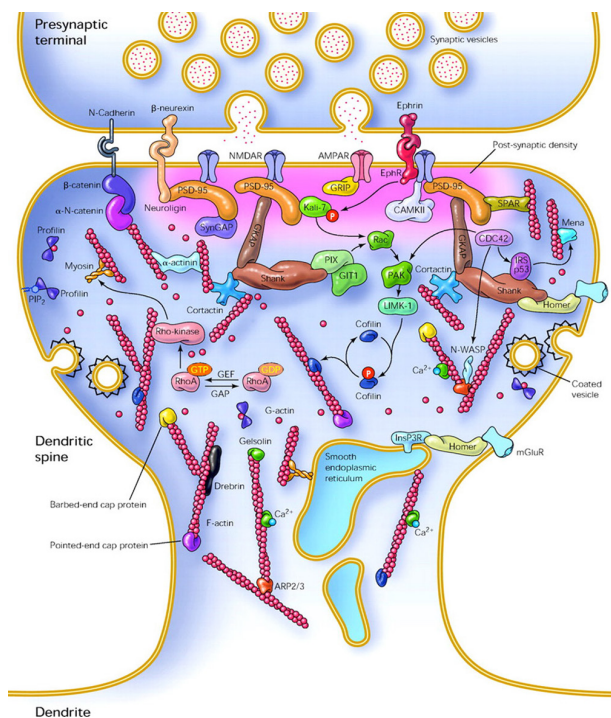


Figura I3. Proteínas involucradas en el control del citoesqueleto de actina de las espinas dendríticas. Las espinas dendríticas reconocen e integran señales excitatorias tras la detección del glutamato liberado por las vesículas presinápticas a través de receptores AMPA y NMDA en zonas de la membrana sináptica con una matriz proteica densa llamada densidad postsináptica (PSD, en rosa). Estos receptores interactúan con proteínas adaptadoras, como PSD 95, que recluta complejos de señalización (e.g., reguladores de RhoGTPasa o quinasas). Los filamentos de actina conectan los receptores de neurotransmisores con otras proteínas transmembrana o ABPs que regulan la forma y desarrollo de la espina. Moléculas reguladoras de actina entre las que se encuentran la profilina, drebrina o cofilina controlan el grado de polimerización de los filamentos de actina (Imagen adaptada de Calabrese et al., 2006).

Este gran dinamismo requiere de una fina regulación espacial y temporal de la polimerización de actina. A ello contribuye una complicada red de proteínas que se localizan constitutivamente en la espina o llegan a ella en respuesta a estímulo (Luo et al., 2002) (**Figura I3**). En las siguientes secciones describiremos en detalle alguna de estas proteínas con mayor protagonismo en esta tesis.

3.1 Rho GTPasas

Las RhoGTPasas son enzimas de localización ubicua (Govek et al., 2005) que a través de su capacidad para modular el citoesqueleto de actina y también el de microtúbulos, regulan una gran variedad de procesos celulares como la morfología, la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular, procesos de apoptosis, tráfico de membrana, progresión tumoral y respuesta a factores de crecimiento (Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997; Hall, 1998).

Las GTPasas de la familia de Rho se expresan en el sistema nervioso central y se ha descrito la presencia de las más caracterizadas como son RhoA, Rac1, Cdc42, junto con sus efectores, en espinas dendríticas de distintos tipos neuronales (**Figura I3 e I4**) (Hashimoto et al., 1999; Olenik et al., 1997) donde juegan un papel esencial en su formación, maduración y mantenimiento (Tashiro et al., 2000) a través de la modulación del citoesqueleto de actina (Luo et al., 1996; Ruchhoeft et al., 1999; Theadgill et al., 1997).

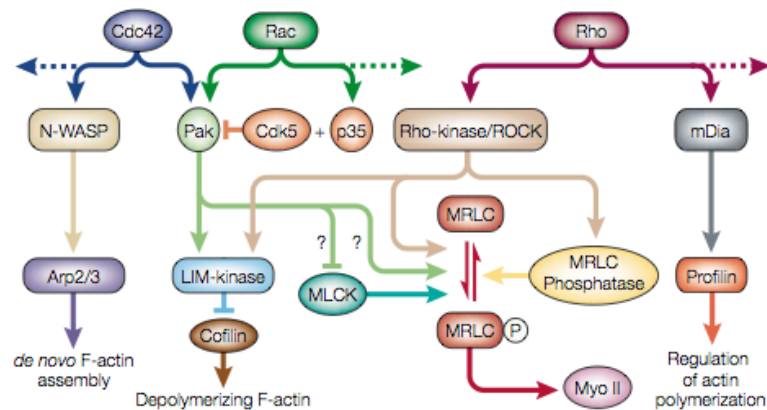


Figura I4: Principales vías de señalización entre las RhoGTPasas y el citoesqueleto de actina en neuronas. Las flechas en punta indican activación, sin punta, indican inhibición. Las flechas punteadas indican que existen efectores intermediarios para cada GTPasa en la regulación de la morfología neuronal. Arp 2/3 actin related proteins 2 & 3; Cdc42: cell division cycle 42; Cdk5: cyclin-dependent protein kinase 5; LIMKinase : Lim domain containing protein kinase; mDia: mammalian diaphanous; MLCK: myosin light chain kinase; MRCL: myosin II regulatory light chain; Myo II: myosin II; N-WASP: neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome protein; p35: the essential subunit of Cdk5; Pak: p21-activated protein kinase; Rac: Ras-related C3 botulinum toxin substrate; Rho: Ras homology gene family member A; ROCK: Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase (Imagen adaptada de Luo, 2000).

3.1.1. Ciclo funcional de las RhoGTPasas

La variedad de eventos celulares en los que las RhoGTPasas están implicadas hacen necesario un control estricto de su activación en el espacio y en el tiempo. Puntos clave de esta regulación son su redistribución desde el citosol a la membrana y el paso de una forma inactiva a otra activa a través del intercambio GDP (guanosine diphosphate) por GTP (Guanosine-5'-triphosphate). Las RhoGTPasas están continuamente alternando entre su estado inactivo (unidas a GDP) y el activo (unidas a GTP). Es en este último estado cuando interactúan con moléculas efectoras para producir la respuesta biológica. Este ciclo está altamente regulado por tres tipos de proteínas GEFs (Guanine nucleotid Exchange Factors), GAPs (GTPasa Activating Proteins) y GDIs (GDP dissociation inhibitors). En condiciones basales las RhoGTPasas se localizan mayoritariamente en el citoplasma unidas a GDIs. El estímulo induce un reclutamiento de GEFs y el complejo GDI-GTPasa a la MP. Los GEFs interactúan con la membrana gracias a modificaciones postraduccionales como la fosforilación, mientras que las Rho GTPasa se unen a la membrana a través de los residuos lipídicos en el extremo C-terminal, como se comentó anteriormente (ver apartado 2.1 (1)). En la MP tiene lugar la rápida disociación entre el Rho GDI y la RhoGTPasa y es entonces cuando el GEF produce el intercambio GDP por GTP. La disociación del GDI de la GTPasa es facilitada por miembros de la familia ERM que secuestran a la GDI (Takahashi et al., 1997). Una vez unida a GTP, la GTPasa interactúa con efectores que a través de sus correspondientes vías de señalización darán lugar a las respuestas celulares. La duración de la señal está estrictamente controlada por la degradación de GEFs mediante ubiquitinación y por la estimulación mediante GAPs de la actividad GTPasa endógena de las RhoGTPasas, la cual suele ser muy baja (**Figura I5**).

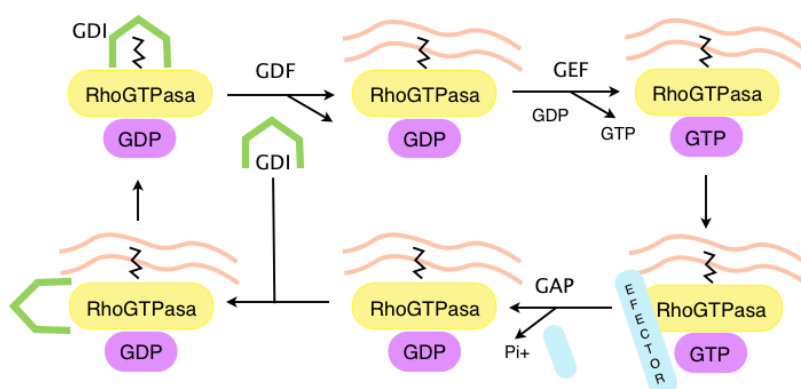


Figura I5: Ciclo de activación e inactivación de las RhoGTPasas. Las RhoGTPasas inactivas unidas a GDP forman un complejo citosólico con GDI. La unión a la MP y la separación entre GDI y la GTPasa son mediadas por un factor de desplazamiento de GDI (GDF). La activación de la RhoGTPasa se da tras el intercambio del nucleótido GDP catalizado por una GEF. En estado activo, las RhoGTPasas reclutan diferentes proteínas efectoras y vuelven a su estado inactivo tras la hidrólisis de GTP a GDP mediada por una GAP. En estado inactivo, la GTPasa es reconocida y extraída de la membrana por una GDI.

Por la especial implicación de RhoA en los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, ampliamos a continuación la información sobre esta GTPasa en particular.

3.1.2 RhoA

RhoA controla diferentes vías de señalización esenciales para la estabilidad del citoesqueleto de actina en neuronas de mamíferos. Esta capacidad se debe a la existencia de un gran número de activadores de la GTPasa, así como de proteínas efectoras que responden a su activación. Mientras que Cdc42 y Rac1 muestran un 68% de homología, RhoA presenta un 45% con respecto a las otras GTPasas. Estas diferencias se creen necesarias para la activación específica de cada GTPasa por distintos efectores (Hakoshima et al., 1998). Así se han descrito dos tipos de motivos de unión a RhoA en las diferentes proteínas que interactúan con ella. Por un lado, el llamado dominio de clase 1, que es una región poli-básica seguida de un motivo “cremallera de leucina” (leucine-zipper) presente en la proteína quinasa N (PKN), Rofilina y Rotequina (Amano et al., 1996; Reid et al., 1996). Por otro lado, el dominio de clase 2 presente en la quinasa ROCK y en Citron (Madaule et al., 1995; Camera et al., 2003) consistente en una hélice superenrollada (coiled-coil) presente en el C-terminal de estas proteínas.

Entre las funciones de RhoA está su implicación en procesos como la elongación neurítica, el ramificado dendrítico, el crecimiento del cono axónico y la sinaptogénesis (Kozma et al., 1997; Bito et al., 2000; Yamashita et al., 1999; Lesiak et al., 2013). Alteraciones que comprometen la actividad de RhoA causan graves problemas en la conectividad sináptica, como es el caso de la función anómala de la RhoGAP oligofrenina 1 implicada en uno de los desórdenes cognitivos más comunes, el del X- Frágil (Billuart et al., 1998).

Más concretamente en espinas dendríticas, la activación de RhoA se da en la potenciación duradera o LTP, siendo necesaria para la consolidación de este fenómeno de plasticidad a través de la señalización por ROCK y cofilina (Rex et al., 2009). La activación de RhoA en la potenciación a largo plazo provoca una rápida aparición de F-actina en la espinas dendríticas (Fukazawa et al., 2003; Lin et al., 2005), necesaria para el incremento del volumen de la espina tanto de manera transitoria como mantenida, durante la inducción química de LTP (Murakoshi et al., 2011). A través de sus proteínas efectoras ROCK II y Profilinalla (PILa), RhoA actúa como mediador entre los receptores de glutamato y el citoesqueleto de actina (Schubert et al., 2006; Da Silva et al., 2003) gracias a su capacidad de interaccionar con subunidades de receptores de glutamato tanto ionotrópicos (subunidades NMDAR2a y GluR1) como metabotrópicos (mGluRs de tipo I). El estímulo sináptico recibido modula los patrones de esta interacción, que a su vez regula la actividad de RhoA y la estabilidad del citoesqueleto de actina por lo que se proporciona un mecanismo directo entre la señal recibida por los receptores de neurotransmisores y los cambios en la forma de la espina dendrítica en un proceso clave para determinar la fuerza sináptica (Schubert et al., 2006).

Por su relevancia en esta tesis se detallan características de efectores de RhoA y de mGluRs.

3.2 Efectores de RhoA en espinas dendríticas: ROCK II y Profilina IIa

Existen diferentes efectores específicos de RhoA en la señalización capaces de modular el citoesqueleto de actina. En espinas, así como en vías de regulación de la neuritogénesis, RhoA ejerce una importante función a través de sus efectores ROCK II y PIIa (Da Silva et al., 2003).

3.2.1. ROCK II

ROCK II es un efector directo de RhoA. Por su capacidad para fosforilar y activar la cadena ligera de la miosina (MLC), aumenta la contractilidad de la actinmiosina jugando un importante papel en la contracción celular sostenida (Amano et al., 1996, 1998) tanto en tipos celulares no neuronales como en células nerviosas (Hirose et al., 1998; Hong et al., 2002).

Otros sustratos de ROCK son la fosfatasa de MLC (impidiendo la defosforilación de ésta última) y la quinasa LIM (LIMK), que a su vez fosforila e inactiva a la ABP cofilina, impidiendo la despolimerización de actina y promoviendo por lo tanto la estabilización de los filamentos.

Tras la activación de RhoA, ROCK II puede estabilizar F-actina a través de la fosforilación de otra ABP, la PIIa (Da Silva et al., 2003; Witke et al., 2001). La importancia de la vía de señalización RhoA/ROCK para la correcta morfogénesis de la espina se refleja en los efectos causados por alteraciones en los niveles de oligofrenina-1, una GAP que regula negativamente a RhoA. La reducción de sus niveles compromete la morfogénesis de la espina en un proceso dependiente de ROCK y su influencia en la actomiosina, resultando en una disminución significativa en la longitud de las espinas (Govek et al., 2004).

3.2.2. Profilina

La profilina es una pequeña ABP (17 KDa) monomérica presente en la mayoría de los tipos celulares de organismos eucariotas. En ratón, el gen de la profilina II posee dos isoformas derivadas del splicing alternativo, la PIIa y PIIb, que poseen diferentes características bioquímicas y localización subcelular (Di Nardo et al., 2000, Witke et al., 2001). La isoforma PIIa es la mayoritaria en cerebro, siendo la única presente en la membrana sináptica y espinas dendríticas, donde funciona uniendo monómeros de actina, cargándolos con ATP y facilitando su adición al extremo (+) del filamento en crecimiento (Pantaloni & Carlier, 1993). Aunque la mayoría de la PIIa está unida a actina, su afinidad por secuencias ricas en Poli-L-prolina (PLPs) le confiere la capacidad de interaccionar con diferentes proteínas relacionadas con la nucleación y el creci-

miento de los filamentos de actina como son N-WASP, WIP, ERM y forminas (Holt & Koffer, 2001) y otros ligandos como dinamina I, sinapsina, ROCK II, VCP (valosin containing protein). P11a también interacciona con fosfolípidos de membrana como PIP_2 . Gracias a todo ello P11a cumple una importante función en el tráfico de membrana, señalización y polimerización de actina localizada (Witke et al., 1998; Pollard & Borisy, 2003; Blanchoin et al., 2000).

Con respecto a su papel en respuesta a la estimulación sináptica, se ha descrito que P11a es necesaria para la correcta exocitosis de vesículas de neurotransmisor como respuesta a concentraciones elevadas de Ca^{2+} (Pilo Boyl et al., 2007). En el caso del compartimento postsináptico, P11a se dirige a la cabeza de espinas dendríticas de neuronas piramidales de hipocampo en respuesta a la activación de receptores NMDA (Ackermann & Matus 2003; Neuhoﬀ et al., 2005). Además, en este proceso, P11a se acumula en el núcleo donde se asocia con la proteína p42POP (42kDa partner of profilin) un represor transcripcional cuya actividad se ve modulada por la unión a profilina, implicando a ésta en la regulación génica (Birbach et al., 2006).

3.3. Unión de RhoA a la membrana sináptica: papel de los mGluRs.

Como se describió anteriormente la unión a membrana de RhoA, así como de otras Rho GTPasas, requiere la modificación postraducciona de la proteína para facilitar la interacción con los lípidos. Es importante destacar que en la sinapsis la unión a la membrana postsináptica de RhoA sufre además una regulación específica en la que participan receptores de glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. La unión diferencial de RhoA a estos receptores en respuesta a estímulo facilita la reorganización del citoesqueleto de actina mediante una vía de señalización en la que también participan ROCK y P11a (Schubert et al., 2006). Por su especial relevancia en esta tesis pasamos a describir en más detalle algunas características de los receptores metabotrópicos.

Existen hasta el momento 8 miembros conocidos de los receptores de glutamato metabotrópicos, mGluR1-8. Todos ellos son receptores acoplados a proteínas G (GPCR). El grupo I lo componen mGluR1 y mGluR5 que en neuronas maduras se localizan principalmente en las regiones circundantes al PSD (Lujan et al., 1997). Están acoplados a través de Gq/G11 a la fosfolipasa C (PLC), cuya activación genera inositol (1,4,5)-trifosfato (IP_3), con la consecuente liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares y generación de diacilglicerol (DAG) (Conn & Pin, 1997).

Tras la estimulación con glutamato o agonistas como el 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG), (Schoepp et al., 1994) los mGluRs I modulan la actividad de gran cantidad de quinasas del tipo serina-treonina, incluyendo la proteína quinasa C (PKC), PKA, proteína mitógeno-activada quinasa (MAPK-ERK) y quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (Aramori & Nakanishi, 1992; Peavy & Conn, 1998; Dale et al., 2000). Estas quinasas fosforilan gran variedad de sustratos, modulando respuestas celulares, entre ellas la desensibilización por fosforilación del propio receptor por

PKC (Alaluf et al., 1995; Francesconi & Duvoisin, 2000) o fenómenos de plasticidad como la LTD dependiente de mGluRs inducida por la vía de ERK (Gallagher et al., 2004). Alteraciones en estos receptores son responsables de graves deficiencias cognitivas, dada su influencia en la estabilidad de mRNA y regulación de la traducción de proteínas de manera local en la sinapsis (Todd et al., 2013; De Rubeis et al., 2012; Waung et al., 2008; Ronesi & Huber, 2008).

Entre las proteínas interactoras que influyen en la actividad de los mGluRs se encuentran algunas proteínas estructurales de la membrana postsináptica como las isoformas de la proteínas Homer (Homer 1a; Homer 1b/c), con las que forman complejos multiproteicos reguladores de su ensamblaje y correcta señalización (Ango et al., 2000; Kammermeier & Worley, 2007; Mao et al., 2005; Mao et al., 2008). Además la distribución y localización de mGluRs en la MP está modulada por la composición lipídica de ésta. Así, una secuencia consenso presente en el receptor denominada CRAC (Cholesterol Recognition Aminoacid Consensus) media su interacción con el colesterol y los dominios lipídicos de membrana enriquecidos en este lípido (balsas lipídicas o rafts) que regulan la correcta localización, señalización y reciclaje (Kumari et al., 2013; Francesconi et al., 2009).

4. LÍPIDOS Y ESPINAS DENDRÍTICAS

La membrana postsináptica ha de integrar la información que recibe y transmitirla al interior celular. La maquinaria proteica que la compone, que incluye receptores de neurotransmisores, proteínas de andamiaje o proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, juega un papel esencial en esta integración y en los últimos años se ha caracterizado en detalle. Sin embargo, se conoce mucho menos sobre el papel de los lípidos de las membranas neuronales a pesar de que son los componentes mayoritarios. Aspectos como la compartimentalización, curvatura o la capacidad fusogénica de las membranas están determinadas por las propiedades fisicoquímicas de los lípidos que las componen (Lentz et al., 1987). Como se describió anteriormente la interacción con la membrana y sus lípidos modula también la actividad de numerosas proteínas sinápticas incluyendo receptores de neurotransmisores o proteínas relacionadas con actina.

Entre los componentes lipídicos minoritarios de la membrana postsináptica cabe destacar a los Fosfoinosítidos (Phosphoinositides, PIPs). La presencia en espinas dendríticas de enzimas metabólicas (i.e. PTEN, PLCgamma o PIP5K) que regulan la cantidad de PIPs con diferentes estados de fosforilación (i.e. fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃) o (4,5) bifosfato (PIP₂)) y cambian actividad y localización en respuesta a estímulos, indica el relevante papel de estos lípidos en la plasticidad sináptica. Así, el dinamismo de PIPs en espinas regula el citoesqueleto de actina, la síntesis proteica local y la concentración y distribución de proteínas clave en plasticidad como PSD95 y AMPARs (Arendt et al., 2010; Yin & Janmey, 2003; Kelleher et al., 2004; Horne & Dell'Acqua, 2007).

Como componentes lipídicos mayoritarios especialmente enriquecidos en la membrana postsináptica, destacamos el colesterol y los esfingolípidos (SLs) a los que se dedican los próximos apartados.

El colesterol es el lípido más abundante en las membranas neuronales (incluyendo la sináptica), siendo un elemento determinante de su fluidez (London, 2005; Coorsen & Rand, 1990) ya que ocupa los espacios intersticiales entre las cadenas hidrofóbicas de los fosfolípidos. El colesterol determina la curvatura de la membrana, el movimiento lateral de sus moléculas y los procesos de exo y endocitosis (Rodal et al., 1999; Subtil et al., 1999; Huttner & Schmidt, 2000). La reducción de los niveles de colesterol provoca la pérdida de sinapsis excitatorias e inhibitorias, (Hering et al., 2003; Pontier et al., 2008). Además, el propio estímulo excitatorio modula los niveles de este lípido y así la estimulación glutamamérgica aguda lleva a una reducción moderada y transitoria de colesterol en la membrana mediada por la enzima Cyp46 (24S-cholesterol hydroxylase) (Sodero et al., 2011). La disminución crónica de colesterol sináptico contribuye a la pérdida de memoria en edad avanzada por mecanismos que afectan vías de señalización y la movilidad de AMPARs (Martín et al., 2014).

Los SLs son lípidos polares abundantes en las membranas de células nerviosas donde afectan profundamente a las propiedades estructurales (Schwarz et al., 1995), el ordenamiento lateral, la función de proteínas asociadas a ellas y generan importantes mediadores lipídicos intra y extracelulares. Están enriquecidos en las membranas pre y postsinápticas y tanto sus niveles, como su interacción con el colesterol, influyen en procesos de fusión de vesículas sinápticas, deformación de membrana, fluidez de moléculas y en consecuencia en la fuerza y eficacia de la transmisión sináptica (Cheng & London, 2011; Churchuard et al., 2005; Haque et al., 2001; Linetti et al., 2010; Sugiura et al., 2008).

Las propiedades biofísicas de estas moléculas determinan su compartimentalización en la célula. Así, algunos SLs pueden ser lo suficientemente anfipáticos como para encontrarse en el citosol, el lumen de un orgánulo o el espacio extracelular, mientras que otros restringen su localización a la bicapa lipídica. La importancia de esta compartimentalización se traduce en la estricta regulación de las enzimas biosintéticas y catabólicas de los SLs (Gault et al., 2011).

Los SLs son sintetizados en el retículo endoplásmico (ER) a partir de precursores y gracias a la acción coordinada de diferentes enzimas que producen de novo la Cer, el esqueleto hidrofóbico de los SLs, constituida por Esfingosina y ácidos grasos de cadena larga que pueden ser heterogéneos en su composición. La Cer participa en las características fusiogénicas de las membranas, así como en la generación de corrientes postsinápticas y la inserción de receptores NMDA (Wheeler et al., 2009) además de ser necesaria para la maduración de espinas dendríticas (Carrasco et al., 2012). Tras el transporte vesicular de la Cer al Golgi es en este compartimento donde se sintetizan SLs complejos como los Glicoesfingolípidos (GSL) y la SM mediante la incor-

poración de grupos hidrofílicos de oligosacáridos o de fosfocolina, respectivamente (Jeckel et al., 1990; Tafesse et al., 2006).

La SM constituye el 10% de los SLs complejos en mamíferos y su síntesis es necesaria para la viabilidad celular (Tafesse et al., 2007). Se sintetiza por la transferencia de fosfocolina a la Ceramida por la acción de las SM sintetasas 1 y 2 (Huitema et al., 2004) en el cis-medial Golgi y, en un pequeño porcentaje, en la membrana plasmática. En el cerebelo, se ha descrito también su síntesis en el trans Golgi y en vesículas de la vía endocítica (Allan & Kallen, 1994). Las alteraciones en el metabolismo de la SM en neuronas constituyen la base de nuestro trabajo en esta tesis doctoral, por lo que ampliaremos la información sobre este tema y sus implicaciones patológicas en el apartado 5.

Los SLs y el colesterol adquieren particular relevancia en la compartimentalización de las membranas y en fenómenos de señalización gracias a su capacidad para formar microdominios llamados balsas lipídicas o rafts que están particularmente enriquecidos en las espinas dendríticas (Dotti et al., 2014).

4.1 Balsas lipídicas o rafts.

Los rafts lipídicos son dominios de membrana de pequeño tamaño (10-200nm) enriquecidos en colesterol y SLs, muy dinámicos y heterogéneos en su composición proteica. Los SLs poseen cadenas largas de ácidos grasos saturados que se disponen de manera organizada en la membrana, proporcionando un estado ordenado de mínima fluidez. Su compactación aumenta por la presencia de moléculas de colesterol que se empaquetan entre los SLs (Simons & Ikonen, 1997). Debido a su composición lipídica los rafts son resistentes a la extracción por detergentes no iónicos a bajas temperaturas (Simons & Toomre, 2000) y por ello también son conocidos como DRM (Detergent Resistent Membranes). Las proteínas asociadas a estos microdominios son de diferente naturaleza e incluyen: (1) proteínas ancladas a glicosil fosfatidil inositol (GPI) intercaladas en la mitad exoplásmica de la bicapa lipídica de la membrana (Hooper, 1999); (2) proteínas unidas covalentemente a grupos mirístico y palmítico que se unen por la cara citosólica de la bicapa lipídica (Liang et al., 2003); (3) proteínas con dominios transmembrana hidrofóbicos, susceptibles de atravesar de un lado a otro la membrana (Scheiffele et al., 1997); (4) Tirosina quinasas aciladas de la familia Src y (5) proteínas directamente asociadas a colesterol como caveolina (Simons & Ikonen, 1997; Simons & Toomre, 2000) (**Figura I6**).

Numerosos estudios demuestran la importancia de los rafts en el tráfico de membrana (Parton & Richards, 2003) regulando procesos de endocitosis y exocitosis (Nichols & Lippincott-Schwartz, 2001; Salaün et al., 2005). Son también necesarios para la segregación de territorios de la MP en células polarizadas como es el caso del establecimiento y mantenimiento de la polaridad axonal en neuronas (Ledesma et al., 1998).

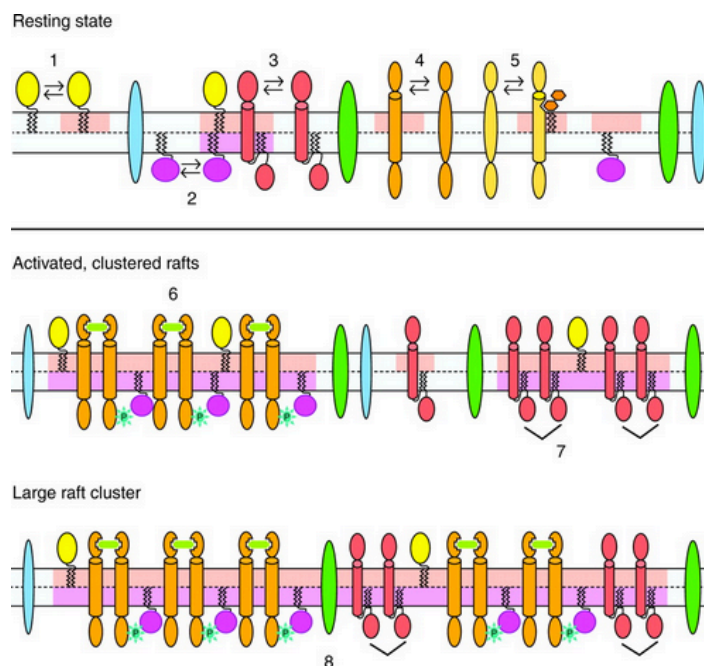


Figura 16: Diferentes estados de los rafts lipídicos: En un estado de “reposo” los rafts son agrupaciones dinámicas nanoscópicas de lípidos y proteínas que son metaestables, es decir, persisten durante cierto tiempo (esquema superior). La relación entre las caras exoplásmica (constituida por SLs y colesterol, (en color rosa)) y endoplásmica (en color morado) de la bicapa lipídica no se conoce en profundidad. La mayoría de proteínas asociadas a rafts se encuentran ancladas mediante GPI a la cara exoplásmica (1), doblemente aciladas en la cara citoplásmica de la bicapa (2) o bien pueden contener cadenas de ácidos grasos en su dominio transmembrana (3). Otro grupo de proteínas asociadas son aquellas que sufren cambios conformacionales al contactar con los rafts lipídicos (4) o aquellas que se unen a ellos mediante GSLs (5). Las proteínas asociadas a rafts pueden oligomerizarse por diferentes ligandos (6) o por proteínas citoplásmicas estructurales (7), lo que genera que el microdominio lipídico vaya fusionándose hacia una estructura más estable, que funciona como plataforma de señalización. Los rafts de mayor tamaño surgen al fosforilarse ciertas proteínas, lo que incrementa la interacción entre ellas, produciendo el ensamblaje hacia dominios de escala de cientos de nanómetros (8) (Imagen adaptada de Simons & Sampaio, 2011).

Gracias a su capacidad de compartimentalización de la membrana, los rafts participan en la señalización celular al promover o no la formación de complejos proteicos en respuesta a estímulo (Simons & Toomre, 2000). Además, interactúan con el citoesqueleto de actina subyacente (Caroni, 2001; Itoh et al., 2001) participando en procesos de motilidad y protrusión de la membrana como microvellosidades y lamelipodios (Gomez-Moutón et al., 2001).

En las sinapsis y espinas dendríticas los rafts actúan como elementos organizadores y de ensamblaje de moléculas como los receptores de neurotransmisores o proteínas de la PSD, regulando la neurotransmisión y siendo imprescindibles para la eficacia sináptica (Hering et al., 2003; Korade & Kenworthy, 2008). A la membrana postsináptica se ancla un complejo de señalización multiproteico con componentes que presentan

modificaciones típicas de proteínas asociadas a rafts, como son la proteína de la densidad postsináptica PSD95 y la proteína que interacciona con receptores de Glutamato (GluR-interacting protein) GRIP (Topinka & Bredt, 1998; Yamakazi et al., 2001). Este complejo se conecta con el citoesqueleto de actina contribuyendo a su reorganización que confiere dinamismo a las espinas dendríticas. La comunicación rafts-actina es bidireccional, de manera que la red de filamentos de actina controla la difusión lateral de proteínas transmembrana en estas regiones anclándolas a la bicapa lipídica, lo que es importante para su estabilización y señalización (Renner et al., 2009; Kusumi et al., 2005). Este es el caso de Homer, una proteína de andamiaje de la densidad postsináptica (Kuriu et al., 2006). La presencia de actina, α -actinina (Pavalko et al., 1991), RhoGTPasa (Rac1 y RhoA) y otras proteínas implicadas en la remodelación de actina en rafts refuerza esta comunicación (Gingras et al., 1998; Kawamura et al., 2003; Suzuki et al., 2011).

Los rafts regulan el tráfico vesicular de receptores de neurotransmisores basado en actina (Carroll et al., 2001; Li et al., 2003; Sheng & Lee, 2001) así como su difusión lateral en el plano de la MP (Choquet & Triller, 2003; Groc et al., 2006; Heine et al., 2008). La eliminación tanto de colesterol como de SLs desestabiliza el reclutamiento de los receptores AMPA en neuronas hipocámpales (Hering et al., 2003) y previene el flujo de Ca^{2+} dependiente de NMDA en neuronas piramidales (Frank et al., 2004) inhibiendo la LTP en el hipocampo (Frank et al., 2008).

La membrana de las espinas dendríticas se ha descrito como un territorio rico en rafts. No en vano, la disminución de los niveles de sus lípidos constituyentes, SLs o colesterol en neuronas conlleva la pérdida de espinas (Hering et al., 2003).

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido comprender el papel de los SL, en particular la SM, en la fisiología y patología de las espinas dendríticas.

5. ESFINGOMIELINA, ESFINGOMIELINASAS Y ENFERMEDAD DE NIEMANN PICK TIPO-A.

La SM es el SL complejo más abundante en células nerviosas. Se sintetiza en el Golgi y en la membrana plasmática en cuya cara exoplásmica está particularmente enriquecida. Su movimiento en la membrana se ve restringido por sus características físico-químicas, de manera que requiere de flipasas para su desplazamiento de una cara a otra de la bicapa lipídica (Gault et al., 2010). La SM influye en el metabolismo del colesterol, regulando el índice de disociación de éste a la membrana plasmática (Barenholz et al., 1980) y modulando por tanto su fluidez. Sus niveles en neuronas regulan la sensibilidad al Ca^{2+} , la cinética de fusión tardía (Rogasevskaia & Coorssen, 2006), la excitabilidad neuronal en hipocampo (Norman et al., 2010) así como la efectividad de la transmisión sináptica (Camoletto et al., 2009).

Los mecanismos mediante los cuáles la SM ejerce sus efectos son campos de estudio bastante inexplorados, pero se sabe que su catabolismo es esencial para la homeostasis de la MP y sináptica.

5.1 La esfingomielinasa neutral 2 (NSM2)

La NSM2 es la principal responsable del catabolismo de SM en la MP y está enriquecida en cerebro (Wu et al., 2010; Stoffel, 1999; Marchesini et al., 2004; Sawai et al., 1999). Codificada por el gen SPMD3 (Hofmann et al., 2000), la NSM2 es una proteína de 71KDa que pertenece a la subfamilia de DNase1 (Clarke et al., 2006). Consta de dos motivos transmembrana en el N-terminal. El sitio catalítico está en el C-terminal en una región altamente palmitoilada.

Aunque la principal localización celular de la NSM2 es la MP también se ha descrito en el aparato de Golgi y en compartimentos de reciclaje de membrana (Tani & Hannun, 2007; Hofmann et al., 2000; Stoffel et al., 2005; Milhas et al., 2010). Su actividad óptima se da a pH 7.4 y es dependiente de cationes Mg^{2+} (Rao & Spence, 1976). Su deficiencia o inhibición causa enfermedades no neurológicas como la Osteogénesis imperfecta (Aubin et al., 2005) y la Condrodisplasia (Stoffel et al., 2005), y tiene efectos negativos sobre la memoria espacial y la estructura sináptica en ratones (Tabatadze et al., 2010).

Ya que esta enzima regula la principal vía de producción de Cer y otros metabolitos activos en señalización como respuesta al estrés celular inducido por distintos factores como las citoquinas, estrés oxidativo, péptido β -amiloide o la óxido nítrico sintasa (NOS) (Okamoto et al., 2002; De Palma et al., 2006; Zeng et al., 2005), la NSM2 está implicada en procesos de crecimiento celular, apoptosis, inflamación y diferenciación (Marchesini et al., 2004; Clarke et al., 2007; Devillard et al., 2010).

Se ha descrito como molécula clave para la polarización y correcta distribución de numerosas moléculas cuya función depende del anclaje a la membrana como las RhoGTPasas Rac1 y RhoA (Sitrin et al., 2011). Recientemente la NSM se ha descrito como reguladora del tamaño de espinas dendríticas a través de la modulación de los niveles de SM en la membrana sináptica en animales deficientes en WIP (Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein) donde NSM se encuentra activa constitutivamente (Franco-Villanueva et al., 2014).

En la membrana postsináptica la NSM se localiza en rafts lipídicos (Veldman et al., 2001) donde puede ser activada por el factor de necrosis tumoral TNF α , a través del receptor de este último y proteínas asociadas a él como FAN y RACK1 (Clarke & Hannun, 2006; Tcherkaskowa et al., 2002), lo que induce el reclutamiento y activación de receptores NMDA facilitando el incremento de corrientes excitatorias dependientes de Ca^{2+} (Wheeler et al., 2009). Además la acción conjunta de NSM2 junto con DAG, regula procesos de fusión de membrana que afectan al tráfico de neurotransmisores en la sinapsis (Jeon et al., 2005).

Su actividad puede ser regulada por fosfolípidos aniónicos (Marchesini et al., 2003), mediante fosforilación por la proteína quinasa C δ (PKC δ) (Clarke et al., 2007, 2008) y mediante defosforilación por la fosfatasa Calcineurina (CaN) (Filosto et al., 2010).

5.2 La esfingomielinasa ácida (ASM).

La ASM o esfingomielina fosfodiesterasa es otra de las enzimas catabólicas de la SM, que hidroliza el enlace de fosforilcolina y genera Cer y fosfocolina (PCho) (Schuchman, 2010; Stoffel, 1999). Esta glicoproteína funciona a un pH óptimo de 4.5-5, lo que la clasificó como una proteína lisosomal y endosomal (Fowler, 1969). Es codificada por el gen SPMD1 en la región cromosomal 11p 15.4 (Simonaro et al., 2006) y se expresa como una pre-proteína de 75KDa que presenta sitios de N-glicosilación, ocupados por manosa-6-fosfato, característico de enzimas con destino lisosomal, que además preservan a la enzima de su degradación en dicha localización subcelular (Schissel et al., 1998; Ferlinz et al., 1997). El mismo gen codifica para una esfingomielinasa de 52 KDa, cuya actividad depende de cationes Zn^{2+} y que es secretada al espacio extracelular, donde accede a la SM en lipoproteínas de baja densidad (low density lipoproteins, LDLs) a pH fisiológico (Ferlinz et al., 1994; Schissel et al., 1996; Spence et al., 1989).

Aunque la ASM se considera una enzima lisosomal, diferentes estudios muestran que frente a estímulos estresantes, puede traslocarse a la cara exoplásmica de la MP, donde desempeña una función importante al generar lípidos bioactivos en señalización implicados en la muerte o supervivencia celular (Smith & Schuchman, 2008; Gulbins et al., 2003). La SNARE Syntaxin 4 media por exocitosis la translocación a la MP de la ASM donde esta enzima inhibe la proliferación celular al generar Cer (Perrotta et al., 2010). Por otro lado, la exposición a radiación ultravioleta aumenta la fosforilación de la ASM por la proteína quinasa C δ (PKC δ) lo que la dirige a la MP y facilita su funcionamiento a pH fisiológico (Zeidan & Hannun, 2007; Zeidan et al., 2008).

La relevancia y posible localización de la ASM en la sinapsis son campos muy poco explorados pero los graves defectos cognitivos que provoca su carencia, que se explican a continuación, sugieren un importante papel.

5.3 Enfermedad de Niemann Pick tipo A (NPA)

Mutaciones que en su mayoría afectan a la región codificante del exon 2 del gen SPMD1 y producen la pérdida de función de la ASM (actividad menor del 1% de la normal) causan la NPA. Cuando las mutaciones conservan parcialmente la actividad de la enzima (más de un 5% de la normal) dan lugar al tipo B de esta enfermedad (NPB) (Levrán et al., 1991; Brady et al., 1966). Ambos tipos son considerados como enfermedades metabólicas lisosomales y cursan con anomalías en distintos órganos dando lugar a hepatoesplenomegalia, insuficiencia pulmonar y alteraciones cardiovasculares (Schuchman, 2007). Sin embargo, mientras que el tipo B no tiene implicaciones neurológicas y los pacientes sobreviven hasta la vida adulta, el tipo A está caracterizado por una rápida neurodegeneración que produce un severo retraso mental y la muerte temprana en la infancia sin posibilidad de tratamiento (Brady et al., 1966).

Se han generado ratones carentes de ASM (ASM^{-/-}) que presentan un fenotipo similar al de la NPA humana. Los ratones ASM^{-/-} son normales al nacer pero el rápido avance de la enfermedad les provoca alteraciones motoras a partir de los 2 meses de edad que terminan en ataxia y la muerte temprana en torno a los 8 meses (Horinouchi et al., 1995; Otterbach & Stoffel, 1995) (**Figura 17**).

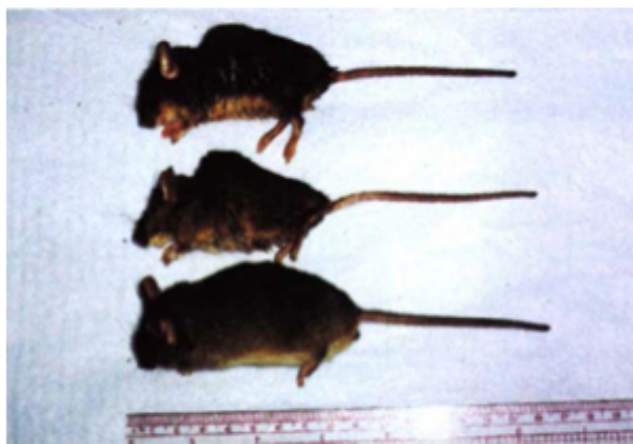


Figura 17: Fenotipo de los ratones ASM^{-/-}: Cabe destacar la reducción en tamaño de los animales deficientes en ASM^{-/-}, así como su apariencia encorvada en comparación con un animal silvestre (ASM^{+/+}) (situado en la parte inferior de la imagen) a los 4 meses de edad. (Imagen adaptada de Horinouchi et al., 1995)

Estos ratones han permitido ensayar posibles terapias para NPA. Entre ellas se probó el reemplazo de la ASM defectuosa mediante la inyección intravenosa o intracraneal de la enzima recombinante o mediante terapia génica con vectores virales. Se obtuvieron mejoras en las alteraciones sistémicas de la enfermedad y cierta recuperación de las anomalías neuronales como el retraso de la neurodegeneración en cerebelo pero que no perduró en el tiempo (Miranda et al., 2000; Dodge et al., 2005; Passini et al., 2005). Otros estudios han empleado células modificadas genéticamente como células madre mesenquimales codificando la enzima (Jin et al., 2002) ó células neurales progenitoras (NPCs) (Shihabuddin et al., 2004), pero los resultados tampoco han sido satisfactorios para tratar el impacto en el cerebro.

Los ratones ASM^{-/-} han permitido también comenzar a entender la patología de la NPA. El análisis lipídico de extractos cerebrales de estos ratones reveló un incremento de 6 veces en los niveles de SM en comparación con ratones silvestres (ASM^{+/+}) mientras que los niveles de otros lípidos como el colesterol o fosfolípidos no estaban significativamente alterados (Galvan et al., 2008; Scandroglio et al., 2008). El análisis detallado de la compartimentalización subcelular del acúmulo de SM, constató que éste no se produce en las membranas del Golgi y que afecta de manera similar a las membranas lisosomales y a la MP (Galvan et al., 2008).

El aislamiento de sinaptosomas derivados de ratones ASM^{-/-} y ASM^{+/+}, permitió concluir que el incremento de SM y de su derivado Esfingosina (Se) también se da en la membrana sináptica (Camoletto et al., 2009).

La deficiencia de ASM tiene consecuencias en distintos tipos celulares del cerebro. Por un lado produce alteraciones en la glía, bloqueando la liberación de citoquinas como IL-1 β por parte de los astrocitos (Chiulli et al., 2007; Bianco et al., 2009) además de causar una hipomielinización de los oligodendrocitos maduros (Buccinna et al., 2009).

En el caso del cerebelo, se da una acusada degeneración de las neuronas de Purkinje de la capa granular, con un patrón temporal y espacial determinado (Macauley et al., 2008; Sarna et al., 2001). Debido a ello, los ratones ASM^{-/-} muestran alteraciones motoras a una edad temprana que deriva en falta de respuesta a estímulos y ataxia (Macauley et al., 2008).

Desde el punto de vista molecular el incremento de SM en la MP altera la composición de los DRMs en neuronas ASM^{-/-}. Esto dificulta la endocitosis de moléculas como el gangliósido GM1 y proteínas ancladas a GPI como la proteína Prion debido la falta de unión a membrana y consecuente activación de la GTPasa RhoA (Galvan et al., 2008). Como resultado estas moléculas se deslocalizan en las dendritas en lugar de estar enriquecidas en el axón como sucede en una situación ASM^{+/+} (Galvan et al., 2008). La acumulación de SM en la membrana sináptica y de su derivado esfingosina (Se), disminuye el reclutamiento de vesículas de neurotransmisores en la terminal presináptica por un mecanismo que altera la interacción del factor citosólico Munc 18 y la syntaxina 1 (Toonen & Verhage, 2007; Camoletto et al., 2009) afectando a la plasticidad presináptica.

Considerando las alteraciones en aprendizaje y memoria con las que cursa la NPA, se comenzó a explorar en nuestro laboratorio el efecto que el metabolismo alterado de SM tiene en el compartimento postsináptico en ratones ASM^{-/-}. El análisis DiO-lístico, utilizando marcaje con Dil (1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (Staffend & Meisel, 2011) y microscopía confocal reveló una reducción en el número de espinas dendríticas en el cortex de los ratones ASM^{-/-} comparado con ratones ASM^{+/+}. El mismo análisis en el hipocampo reveló una tendencia parecida pero sin llegar a ser significativa (**Figura 18**).

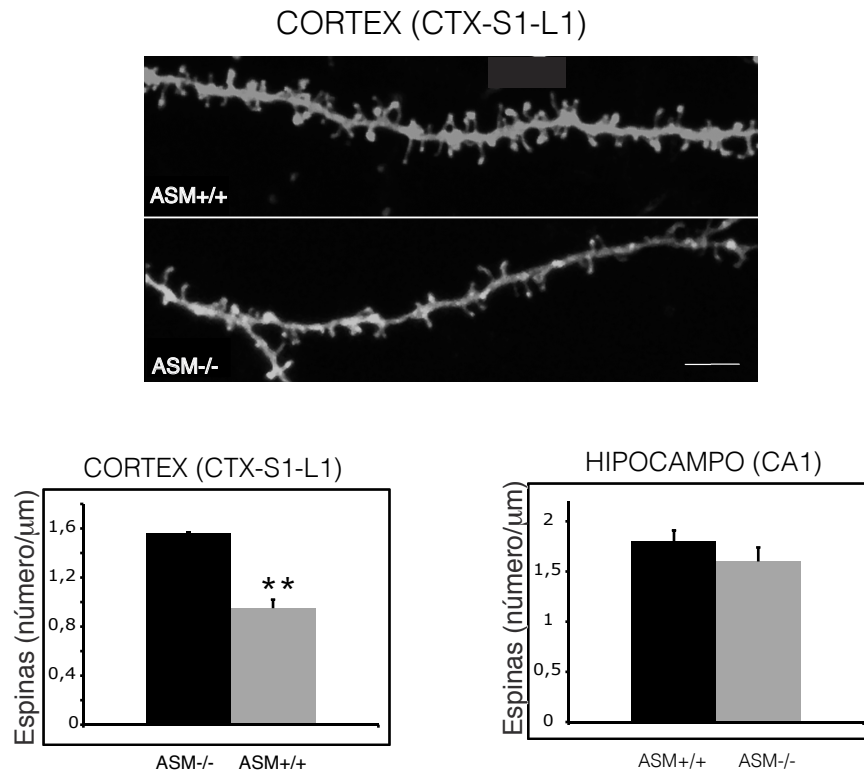


Figura 18: Los ratones ASM-/- tienen un menor número de espinas dendríticas en la capa S1 de la corteza. Arriba, fotografías de microscopía confocal de segmentos dendríticos marcados con Dil pertenecientes a neuronas de la corteza S1/L1 de cerebros ASM+/+ y ASM-/- (n=4, Barra de escala= 5 μm). Las gráficas representan la densidad de espinas por μm dendrítico en la corteza S1/L1 (p=0,01) o en la región CA1 del hipocampo donde las diferencias en el número de espinas no fueron significativas (n=4).

Estos resultados son el punto de partida de esta tesis que se ha centrado en caracterizar el mecanismo molecular que explica las anomalías en las espinas dendríticas y, contando con esta información, en tratar de revertirlas *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVOS

Postulamos que el acúmulo aberrante de SM en la membrana postsináptica altera la polimerización de actina en las espinas dendríticas de ratones ASM-/- lo que lleva a cambios en el tamaño y número de estas estructuras que podrían contribuir a las deficiencias cognitivas de estos ratones modelo para la NPA.

Para comprobar esta hipótesis, planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar el fenotipo de las espinas dendríticas (número, tamaño y contenido de actina polimerizada) en distintas regiones del cerebro y en neuronas en cultivo de ratones ASM-/-.
2. Determinar las alteraciones lipídicas de la membrana postsináptica de ratones ASM-/-.
3. Caracterizar el mecanismo molecular subyacente a las alteraciones en las espinas dendríticas de ratones ASM-/-.
4. Ensayar estrategias *in vitro* e *in vivo* para evitar las anomalías en las espinas dendríticas en ratones ASM-/-.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANTICUERPOS Y MARCADORES

Los anticuerpos primarios, secundarios y otros marcadores empleados para la detección de proteínas, lípidos o DNA se describen en las siguientes tablas con indicación de las técnicas utilizadas: Western blot (WB), Inmunocitoquímica (IC) o inmunohistoquímica (IH).

Tabla M1: Anticuerpos primarios. (PM, peso molecular de la proteína reconocida por el anticuerpo)

ANTÍGENO	ANTICUERPO PRIMARIO	CLASE	PM (KDa)	DILUCIÓN	PROCEDENCIA	REFERENCIA
alpha-tubulina	alpha-tubulina (clon TU-01)	Monoclonal ratón	55	WB 1/20000	Abcam	ab7750
Cdc42	Cdc42 (clon 44)	IgG ₁ de ratón	22	WB 1/1000	BD Bioscience	610929
Calbindina	Calbindina D28K	Policlonal conejo	28	IH 1/500	Merck Millipore	pc253l
Flotilina-1	Flotilina-1 (clon18)	Monoclonal ratón	48	WB 1/1000	BD Bioscience	610821
mGluR1- α	mGluR1- α	IgG de conejo	130	WB 1/1000	Calbiochem	445870
mGluR5	mGluR5	IgG de conejo	132	WB 1/500	Chemicon	AB5675
N-SMasa-2	N-SMasa-2 (clon G-6)	IgG _{2a} de ratón	71	WB 1/1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-166637
Profilina IIa	Profilina IIa	Policlonal conejo	15	WB 1/2000	Santa Cruz Biotechnology	sc-100955
PSD95	PSD95 (clon K28-43)	Monoclonal ratón	95	WB 1/2000 IC 1/500	Neuronmab	75-028
Rac1	Rac1 (clon 102)	IgG _{2b} de ratón	21	WB 1/1000	BD Bioscience	610652
RhoA	RhoA (clon 67B9)	IgG de conejo	23	WB 1/2000	Cell Signalling	#2117
ROCKII	ROCKII (clon 21)	IgG ₁ de ratón	180	WB 1/1000	BD Bioscience	610623
Sinaptofisina	Sinaptofisina (clon 38)	IgG ₁ de ratón	37	WB 1/1000	Abcam	ab 8049
MAP2	MAP2 (clonAA6)	IgG _{2a} de ratón	70	IC 1/1000	Covance	MMS-485R

Tabla M2: Anticuerpos secundarios.

ANTICUERPO SECUNDARIO	CLASE	DILUCIÓN	PROCEDENCIA	REFERENCIA
Anti-Conejo-HRP	Policlonal Cabra	WB 1/2000	Dakocytomation	D0487
Anti-Ratón HRP	Policlonal Conejo	WB 1/2000	Dakocytomation	P0161
Anti-Ratón Alexa647	Policlonal Burro	IC 1/500	Invitrogen	A-31571
Anti-Pollo Alexa555	Policlonal Cabra	IC 1/500	Invitrogen	A-21437
Anti-Conejo Alexa488	Policlonal Burro	IC 1/500	Invitrogen	A-21206
Anti-suero	Policlonal Conejo	IC 1/1000	Peptanova	4802-v

Tabla M3: Reconocimiento de otros marcadores.

OTROS MARCADORES	REACTIVO	DILUCIÓN	PROCEDENCIA	REFERENCIA
Actina polimerizada	Faloidina Alexa 488	IC 1/100	Invitrogen	A-12379
DNA	DAPI Dihydrochloride	IH 1 μ g/ml	Calbiochem	268298
SM	Lisenina	IC 0,1 μ g/ml	Peptanova	4802-v

1. RATONES

1.1 Descripción y mantenimiento

Los ratones deficientes en ASM, de fondo genético C57/BL6, fueron generados por recombinación homóloga mediante un vector de reemplazamiento por el que el exon 2 del gen murino de la ASM queda interrumpido por el gen de resistencia a neomicina (Horinouchi et al., 1995). Para el establecimiento de una colonia de cría se utilizó una pareja de heterocigotos para ASM cedidos amablemente por E.H. Schuchman (Mount Sinai School of Medicine, New York). En los experimentos se compararon ratones ASM+/+ y ASM-/- de la misma edad y sexo según se indica en cada caso.

La colonia se mantuvo en condiciones libres de patógenos específicos en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid (España).

Todos los procedimientos que implicaron el uso de animales se realizaron de acuerdo con las directrices y protocolos establecidos por la Unión Europea (86/609/EEC), revisados y aprobados por el comité institucional de bienestar animal.

1.2 Genotipado

El genotipado se realizó mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los siguientes oligonucleótidos (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EEUU).

PS: 5'-AGCCGTGTCCTCTTCCTTAC-3'

PA1: 5'-CGAGACTGTTGCCAGACATC-3'

PA2: 5'-GGCTACCCGTGATATTGCTG-3'

En un ratón ASM+/+ se amplifica una secuencia de 269 pares de bases correspondientes al gen endógeno de ASM, mientras que en un ratón ASM-/- el producto de la amplificación es de 523 pares de bases correspondiente a la combinación de la pareja de oligonucleótidos PS y PA2 (**Figura M1**).

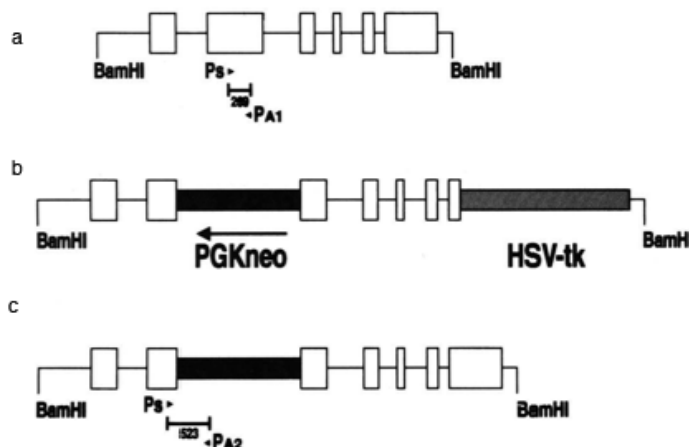


Figura M1 : Estructura del gen endógeno de la ASM y estructura del alelo tras la recombinación homóloga. **a.** Los exones se muestran con cajas blancas, PS y PA1 son los oligonucleótidos empleados para detectar el gen endógeno. **b.** Vector de reemplazamiento empleado para la interrupción del alelo. **c.** Gen ASM interrumpido. El oligonucleótido PA2, específico de neo (gen de resistencia a neomicina) detecta el alelo diana (Imagen adaptada de Horinouchi et al., 1995)

El ADN genómico se obtuvo a partir de un fragmento de cola de ratón empleando el método estándar de precipitación con isopropanol (Laird et al., 1991). La reacción de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: cada reacción de amplificación (100µl finales) contiene 100pmol de cada oligonucleótido, 1 µg de DNA genómico, 1x PCR Buffer (Promega), 1,5 mM MgCl₂, 5 U de Taq polimerasa (Promega) y 200µM de dNTPs. Se usó un programa de 30 ciclos, cada uno de ellos consistente en 1 minuto de desnaturalización a 93°C, 1 minuto de anillamiento a 58°C y 1 minuto de extensión a 72°C.

2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

2.1 Neuronas Hipocampales

Los cultivos de neuronas primarias disociadas se prepararon siguiendo el protocolo descrito en Dotti et al., (1988) y en Kaech & Banker, (2006). El protocolo se realizó bajo condiciones de esterilidad, trabajando en una campana de flujo laminar. Se diseccionó el cerebro y se extrajo el hipocampo de embriones de ratón E18 (del genotipo ASM+/+ y ASM-/-) en medio HBSS (Hanks Buffer Salt Solution Ca²⁺ and Mg²⁺ free, GIBCO Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU). El hipocampo se disgregó enzimáticamente con tripsina 0,25% (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) en HBBS y DNase a 1mg/ml, durante 15 minutos a 37 °C. A continuación se disoció mecánicamente el tejido con ayuda de una pipeta Pasteur y las células se resuspendieron en 1 ml de HBSS y se contaron en una cámara de conteo Neubauer. Las neuronas se plaquearon a una densidad de 6000 células/cm² en placas P-60 conteniendo 6 cubreobjetos de 15mm de diámetro en medio de plaqueo compuesto por MEM (Minimun Essential Media, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) conteniendo D-Glucosa al 20% y suero de caballo (Horse Serum heat inactivated, Invitrogen, New Zealand). Esta densidad neuronal asegura el correcto desarrollo y crecimiento del cultivo así como la posterior visualización en microscopía. Los cubreobjetos habían sido previamente esterilizados a 235 °C y tratados con Polilisina (1mg/ml en Tampón Borato durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂), tras lo cual se lavaron y se aplicaron gotas equidistantes de parafina. Una vez adheridas las neuronas al sustrato después de tres horas tras el plaqueo, se voltearon los cubreobjetos con la parafina hacia abajo en placas conteniendo astrocitos procedentes de la corteza de embriones ASM+/+ o ASM-/- respectivamente. En estas condiciones de co-cultivo el medio empleado es NB27, es decir, Neurobasal, suplementado con B27 y Glutamax (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) y las neuronas no están en contacto directo con la monocapa glial pero comparten un medio en el que se permite la difusión de factores solubles. Se realizaron cambios parciales de medio cada 3 días y a partir del octavo DIV (día *in vitro*) se eliminó el suplemento de Glutamax para evitar la posible excitotoxicidad en el cultivo.

2.2 Astrocitos Corticales

Para que el cultivo neuronal crezca y sobreviva más allá de una semana *in vitro*, ha de ser co-cultivado con astrocitos. Por ello, se prepararon cultivos de este tipo glial como se describe en Kaech & Banker, 2006. Se diseccionó la corteza cerebral de crías ASM+/+ o ASM-/- de hasta 5 días postnatales (P0-P5) en HBSS y se digirió con Tripsina al 2,5% y DNasa 1mg/ml durante 15 minutos a 37°C. A continuación se disgregó el tejido mecánicamente con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio en medio MEM suplementado con 0,6% D-glucosa, 10% suero de caballo y Penicilina-Estrep-tomicina 1:1000. La suspensión celular se pasó por un filtro de Nylon (Nitex Screen, Becton, Dickinson, New Jersey, EEUU) y se centrifugó a 120 g durante 7 minutos. El precipitado celular se resuspendió en medio glial, y tras su recuento, se plaquearon $7,5 \times 10^6$ células en Flasks de 75 cm². Se realizaron cambios de medio cada 3 días, agitando ligeramente los recipientes para evitar la adhesión de la microglía, hasta que el cultivo alcanzó confluencia. Tras ello se despegaron las células con Tripsina-EDTA y se plaquearon en P-60 tratadas con polilisina a 10^5 células por placa. Se dejaron crecer en estas condiciones durante 2 semanas aproximadamente cuando la monocapa de astrocitos alcanza el 70% de confluencia. Dos días antes del co-cultivo, se sustituye el medio glial por NB27 para que se equilibre antes del contacto con las neuronas hipocampales.

3. MICROSCOPIA

3.1 Microscopía electrónica de transmisión

Se anestesió a los ratones mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (0,04 mg/kg) (Dolethal; Vetoquinol SA, Francia) tras lo que se perfundieron transcárdialmente con 50ml de tampón fosfato salino (PBS) (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM; pH7,4) seguidos por 50ml de 4% paraformaldehído (PFA) a pH 7,4 y 2% glutaraldehído preparados en PBS. Los cerebros se post-fijaron en la misma solución durante toda la noche y al día siguiente se cortaron con vibratomo en rodajas coronales de 200 µm de grosor. Las rodajas se trataron con tetróxido de osmio al 1% (en tampón cacodylate 0.1M), se rehidrataron en EtOH y se embebieron en Epon-Araldite. Se tiñeron secciones ultrafinas seriadas del CA1 de hipocampo y de la capa molecular de cerebelo con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en microscopio electrónico de transmisión (JEM1010, Jeol, Japón). Las sinapsis se seleccionaron al azar en la zona del stratum radiatum de hipocampo y en la capa molecular cerebelosa y se fotografiaron a una magnificación de x10.000 con una cámara CMOS 4k TemCam-F416 (TVIPS, Gauting). La longitud de las densidades postsinápticas se midió con el software Image JA 1.45b en 100 sinapsis por ratón en tres ratones diferentes por genotipo y grupo de tratamiento.

3.2 Microscopía de fluorescencia

3.2.1. Marcaje con Lisenina

La detección de SM en la membrana neuronal se llevó a cabo mediante el marcaje con Lisenina, una toxina procedente de la lombriz *Eisenia foetida*, que es capaz de unir específicamente SM sin reaccionar con otros esfingolípidos (Yamaji et al., 1998). El ensayo se realizó sobre los cubreobjetos donde se cultivaron las neuronas hasta los 15 DIV. Se fijaron las células con PFA-SEM (PFA 4%, sacarosa 0,12M, EGTA 3mM y $MgCl_2$ 2mM en tampón fosfato) durante 10 minutos. Para evitar la posible auto-fluorescencia en las muestras, se incubaron durante 20 minutos con Cloruro de amonio, NH_4Cl 50mM, y tras ello se bloquearon con 2% albúmina de suero bovino (BSA) y 5% suero de ternera fetal (FBS) en PBS durante 30 minutos. La incubación con Lisenina (Peptanova, Sandhausen, Alemania) se realizó durante una noche entera a una dilución de 0,2 mg/ml a 4°C. Tras tres lavados con PBS, se incubaron las células una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal anti-Lisenina (Peptanova, Sandhausen, Alemania) y por último con un anticuerpo secundario burro anti conejo conjugado con el fluoróforo Alexa 488, bajo las mismas condiciones. Posteriormente las muestras se montaron sobre portaobjetos empleando ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Anxiovert 200 de Zeiss. Cuantificamos la intensidad de fluorescencia en los ejes dendríticos empleando el software Image J y la intensidad media obtenida se refirió a la unidad de área.

3.2.2. Análisis de proteínas y F-actina

Para estudiar la localización de la proteínas de interés por inmunofluorescencia en neuronas en cultivo, se fijaron las células mantenidas a baja densidad con PFA 4% pH 7.4, preparado en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar tres veces con PBS, se trataron las células con NH_4Cl 50mM durante 20 minutos para reducir la autofluorescencia. Tras ello se permeabilizó la MP con 0,15% Triton X-100 preparado en PBS durante una hora a temperatura ambiente y se bloquearon las muestras con 2% BSA, 5% FBS, 0,15% Triton X-100 en PBS durante 30 minutos. Se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa Fluor-647 (emisión en rojo lejano y posterior conversión digital a azul), Alexa Fluor-555 (emisión en rojo). Para marcar la actina polimerizada se empleó Faloidina acoplada a tetrametilrodamina (TRICT) a una dilución de 1:100 (Sigma-Aldrich). Para finalizar las muestras se lavaron 3 veces con solución de bloqueo, dos con PBS y una última vez con agua MilliQ. Se dejaron secar los cubreobjetos durante unos minutos y se montaron con ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific).

En todos los casos se incluyeron controles negativos en paralelo al marcaje de interés, realizando el protocolo aquí descrito pero sin incubar con anticuerpos secundarios. Para la visualización de las preparaciones se empleó un microscopio de fluorescencia Axiovert 200 de Zeiss. La fluorescencia asociada a Faloidina se midió en espinas dendríticas identificadas como protrusiones positivas para el marcaje de PSD95 que salen del eje dendrítico identificado con anticuerpos anti MAP2. Se determinó la intensidad de pixel mediante el programa Image J y se calculó la intensidad media por unidad de área

3.2.3. Análisis de la muerte neuronal

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se diseccionó el encéfalo. Uno de los hemisferios se procesó para inmunofluorescencia de tejido en cerebelo, para lo cual se fijó en PFA 4% durante 24 horas a 4°C y se transfirió a una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en PBS durante dos noches. Tras lavados en PBS las muestras se incluyeron en bloques de Tissue Tek OCT (Sakura) para la posterior obtención de secciones sagitales del tejido de 30 µm de grosor con un criostato (Leica). Las secciones se recogieron por flotación en una solución de Glicol (30% etilenglicol, 26% glicerol y tampón fosfato 0,1M pH7). Posteriormente se separó el cerebelo del resto del corte y se lavó en tampón fosfato (PB), 1% BSA y Triton X-100 1% (solución de bloqueo). Se incubó con el anticuerpo primario anti-Calbindina, marcador específico de la neuronas de Purkinje, durante dos noches a 4°C. Tras realizar 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución de bloqueo, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario de burro Alexa-488 anti-conejo. Tras lavados con PB se incubaron con DAPI (1/5000) durante 10 minutos y se montaron en portaobjetos empleándose ProLong Gold (Invitrogen) como medio de montaje. Las muestras se analizaron en un microscopio de barrido láser confocal LSM 710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). El fluoróforo Alexa-488 se excitó con una línea láser de Argón 488 y su emisión se recogió a través de un filtro de emisión paso banda BP 505-530. Las imágenes se obtuvieron como conjunto de planos focales ó z-stacks, con un objetivo de 63x, zoom de 3,2x y una distancia entre secciones ópticas de 0,14 µm. Calculamos el número de células positivas para Calbindina por unidad de área empleando el programa Image JA 1.45b (Wayne Rasband, NIH, Maryland, EEUU).

4. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

4.1 Extractos totales de cerebro

Los extractos de cerebro total se prepararon en tampón de lisis (Tris HCl 50mM pH 8.0, NaCl 150mM, NP-40 1% y cóctail de inhibidores de proteasas (complete EDTA-free Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)). Se homogeneizó el tejido en vidrio-teflón con pulsos de 245 rpm y tras incubar en hielo durante 10 minutos, se dio

un pulso de centrifugación a baja velocidad recuperándose el sobrenadante para su posterior análisis.

4.2 Aislamiento de sinaptosomas

Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Los cerebros de ratones ASM+/+ y ASM-/- se diseccionaron eliminando el cerebelo, se lavaron con PBS1x y se transfirieron a tubos conteniendo 12 ml de tampón HEPES 5mM pH 7.4, Sacarosa 0.32M, EDTA 1mM y BSA 1mg/ml. Se homogeneizaron con 10-15 pulsos de 245 rpm en vidrio-teflón y se centrifugaron a 3000 *g* durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante (citoplasma y sinaptosomas) y se centrifugó a 14000 *g* durante 12 minutos. El precipitado resultante de esta centrifugación se resuspendió en tampón Krebs-Ringer (NaCl 140mM, KCl 5mM, Glucosa 5mM, EDTA 1mM, HEPES 10mM) y se mezcló con Percoll frío (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EEUU) en proporción 45% vol:vol. La mezcla se centrifugó durante 2 minutos a 17.500 *g*, tras lo cual la fracción sinaptosomal se recuperó en un anillo blanquecino que flota en la parte superior del tubo de centrifuga. Esta fracción se lavó en 1ml de tampón Krebs-Ringer y se centrifugó 30 segundos a 17.500 *g*. El sedimento obtenido corresponde a la fracción sinaptosomal cruda que se resuspendió en tampón Hepes modificado (NaCl 147mM, KCl 3mM, Glucosa 10mM, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 2mM, HEPES 20mM e inhibidores de proteasas) y que se considera funcionalmente activa, capaz de responder a estímulos y tratamientos, durante aproximadamente 4 horas. Por ello este tipo de preparaciones ha sido ampliamente empleada para el análisis *in vitro* de la función sináptica (Camoletto et al., 2009; Schubert et al., 2006). Los tratamientos llevados a cabo en las preparaciones sinaptosomales se describen posteriormente.

4.2.1 Aislamiento de la fracción postsináptica (PSD)

Ampliamos el protocolo anterior para la obtención de una fracción enriquecida en las membranas postsinápticas como describimos a continuación. La fracción sinaptosomal cruda obtenida como se indicó previamente se diluyó 10X con CaCl₂ 0,1mM frío y se mezcló con una solución a pH 6.0 compuesta por Tris HCl 40mM y Tritón X-100 2%, con la que se incubó en hielo durante 30 minutos con ligera agitación. La mezcla se centrifugó 30 minutos a 40000 *g* en un rotor SW41, obteniendo en el precipitado las uniones sinápticas y en el sobrenadante las proteínas extrasinápticas. El precipitado se lavó y resuspendió en la mitad de volumen que anteriormente con Tris HCl 20mM y Tritón X-100 1% a pH 8.0 usando un homogeneizador vidrio-teflón. Se incubó y centrifugó como en el paso anterior y se obtuvo un precipitado conteniendo las densidades postsinápticas que se resuspendieron en 15 μ l de LB 1X para su posterior análisis por WB. El sobrenadante obtenido, conteniendo las proteínas pre-sinápticas, se procesó como se indica en 5.1.2 para su concentración y análisis junto con las fracciones post-sinápticas mediante WB.

4.2.2 Obtención de fracciones de membrana y citosólicas

La separación de fracciones de membrana y citosólicas se obtuvo mediante la centrifugación durante 2 horas a 100000 *g* a 4°C de los extractos sinaptosomales empleando un rotor TLA 100.1 y una ultracentrífuga TL100, ambos de Beckman Coulter. El sedimento y el sobrenadante de la centrifugación corresponden a membrana y citosol, respectivamente.

4.2.3 Aislamiento de rafts lipídicos

Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se emplearon 300 µg de proteína procedentes de las fracciones sinaptosomales de ratones ASM+/+ y ASM-/- que se diluyeron en 1ml de tampón TNE (Tris 100mM, NaCl 2mM, EDTA 10mM pH 7.4) conteniendo Triton X-114 al 0,1% y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Tras su incubación durante 40 minutos en agitación orbital, las muestras se mezclaron con 2,25 ml de sacarosa al 80% en tampón TNE para alcanzar una concentración final del 60% sacarosa. Las muestras se transfirieron a tubos 14x95mm Ultra-Clear (Beckman Coulter; EEUU) y en ellos generamos un gradiente discontinuo de sacarosa diluída en TNE añadiendo 6 ml de solución al 35% y posteriormente 3ml de solución al 5%, todas ellas conteniendo inhibidores de proteasas. Se centrifugó durante 19 horas a 72.500 *g* usando un rotor SW-40 en una ultra-centrífuga Beckman Coulter Optima L-100 XP. Tras la centrifugación se recogieron 13 fracciones de 1ml comenzando por la superficie del tubo. Las primeras 8 fracciones fueron consideradas ligeras o “flotantes” y por tanto resistentes a la extracción con detergentes, correspondientes a los rafts lipídicos.

5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

5.1. Precipitación de proteínas

Para minimizar el volumen de las muestras y hacer posible su análisis mediante Western Blot (que se describe posteriormente) las concentramos mediante precipitación siguiendo los protocolos que se describen a continuación.

5.1.1 Ácido Tricloro Acético (TCA)-EtOH.

El ensayo se realizó a 4°C. Las muestras procedentes de las preparaciones de rafts lipídicos se diluyeron a una concentración final del 20% TCA y se incubaron durante 20 minutos. Tras la incubación, se centrifugaron a 17,500 *g* durante 30 minutos. Descartamos los sobrenadantes y añadimos a los precipitados 1 ml de Etanol absoluto frío como lavado y se centrifugaron a la misma velocidad durante 20 minutos.

Tras dos lavados más con Etanol, dejamos secar a temperatura ambiente el sedimento resultante conteniendo las proteínas precipitadas.

5.1.2 Metanol-Cloroformo (MeOH-CHCl₃).

Empleamos este procedimiento para precipitar las proteínas de las fracciones citosólicas de extractos sinaptosomales. Este protocolo descrito en Wessel & Fugge (1984) permite la recuperación de proteínas a partir de una muestra diluída, además de presentar un paso de delipidación. Por cada 100 µl de muestra se añadieron 400 µl de MeOH 100% mezclando por agitación en vortex tras lo que se añadieron 100 µl de CHCl₃. Después de mezclar de nuevo con vortex, se añadieron 300 µl de agua miliQ, se mezcló el contenido por inversión del tubo y se centrifugó a 9000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se descartó la fase acuosa superior, ya que las proteínas quedan en la interfase, a la que se añadieron 300 µl de MeOH 100%. Una vez mezclada la muestra se centrifugó como se ha descrito anteriormente y se retiró el MeOH restante sin alterar el sedimento proteico dejando secar las muestras a temperatura ambiente.

5.2 Medida de la concentración de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA)

La concentración de proteínas se determinó mediante un kit comercial basado en el método colorimétrico del BCA, Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, EEUU). Este método se basa en la capacidad de las proteínas para reducir en medio alcalino los cationes Cu²⁺ a Cu¹⁺. La reacción de los cationes Cu¹⁺ con el BCA genera un complejo soluble de color púrpura con una fuerte absorvancia a 562 nm. La concentración de proteína se calcula interpolando los datos de absorvancia a esta longitud de onda en una recta patrón elaborada a partir de estándares de BSA con concentraciones de 20 a 2000 µg/ml. La absorvancia de las muestras se midió empleando un fluorímetro FLUOstar optima (BMG LABTECH, GmbH, Otenberg, Alemania).

5.3 Electroforesis de proteínas e Inmunodetección por Western Blot (WB)

Los tampones y soluciones empleadas (matriz gel de poliacrilamida, tampones de electroforesis y tampón de carga) se prepararon como se indica en Sambrook et al., 1989.

A las muestras para electroforesis se les añadió el volumen necesario de tampón de carga 5X (Tris 325mM pH 6.8, SDS 10%, glicerol 25%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,5%) hasta diluirlo 1X y se hirvieron durante 4 minutos a 95°C.

Se cargaron las muestras según la concentración requerida y calculada previamente

por la cuantificación con BCA en los pocillos de geles de poliacrilamida. Se resolvieron según el método descrito en Laemmli 1970, basado en la electroforesis desnaturante en presencia de SDS, que determinará la movilidad y separación de las cadenas polipeptídicas aisladas.

El porcentaje de acrilamida empleado para la elaboración de los geles dependió del tamaño de las proteínas a detectar, variando entre 6%, 8%, 10%, 12% y 15%. Para calcular el tamaño relativo de las proteínas analizadas, se utilizó el marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIORAD, Hercules, California, EEUU).

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinileno (PVDF) ayudándonos del sistema iBlot® 7-minute Blotting System (Invitrogen; Carlsbad, California, EEUU). Para evitar una posible señal inespecífica en la posterior incubación con los anticuerpos, se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 5% o con BSA 5% en PSBT (NaCl 137mM, NaHPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, KCl 2.7mM, Tween 20 0,1% a pH 7.4) durante una hora a temperatura ambiente y con ligera agitación.

Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinileno (PVDF) ayudándonos del sistema iBlot® 7-minute Blotting System (Invitrogen; Carlsbad, California, EEUU). Para evitar una posible señal inespecífica en la posterior incubación con los anticuerpos, se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 5% o con BSA 5% en PSBT (NaCl 137mM, NaHPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 2mM, KCl 2.7mM, Tween 20 0,1% a pH 7.4) durante una hora a temperatura ambiente y con ligera agitación.

Los anticuerpos utilizados aparecen en las tablas M1 y M2 y se incubaron a la dilución indicada en PBSTween con leche en polvo o BSA al 5%, bien durante toda la noche a 4°C o 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. La señal de la peroxidasa se detectó mediante quimioluminiscencia (Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL; Perkin Elmer Life Science, Waltham, Massachusetts, EEUU) o ECL plus (Super Signal* West Dura Chemiluminescence Substrate; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU)).

La cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas se realizó en condiciones de exposición no saturada mediante el software Quantity One. Los datos obtenidos de los ensayos se normalizaron frente a los niveles de tubulina detectados de la misma manera utilizando un anticuerpo específico.

5.4 Inmunoprecipitación (IP)

Para estos ensayos se emplearon muestras sinaptosomales inmediatamente después de su preparación y estimulación con 5 mM KCl ó 55mM KCl. En primer lugar se lisó el material biológico en tampón de IP (1% Triton X-100, NaCl 100mM, EDTA 2mM, Tris-HCl 10mM, Na₃VO₄ 1mM pH7.5 e inhibidores de proteasas, (cóctel de inhibidores de proteasas, COMPLETE™)) durante 20 minutos en hielo y se centrifugó

durante 20 minutos en hielo y se centrifugó a 1600 *g* durante 5 minutos a 4°C para eliminar agregados. A continuación se preparó la proteína G unida a microesferas de sefarosa (Protein G Plus-Agarose Immunoprecipitation Reagent, Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-2002) lavándola por centrifugación a 9000 *g* durante 2 min con tampón de lavado (Tris 10mM pH 7.4, NaCl 150mM, EDTA 1mM pH 8, EGTA 1mM pH 8, Na₃VO₄ 0,2 mM). Posteriormente se preclarificaron los lisados con 20 µl de proteína G-sefarosa lavada durante 2 horas a 4°C en agitación tras lo que se recuperó el sobrenadante obtenido por centrifugación a 1600 *g* donde se estimó la cantidad de proteína como se describe en 5.1.3. A continuación se incubaron las muestras con 3 µg de anticuerpo contra RhoA durante un mínimo de 4 horas a 4°C en agitación orbital, exceptuando los controles negativos a los que no se añadió anticuerpo. Posteriormente se incorporaron a la mezcla las microesferas de proteína G y se incubaron en las mismas condiciones. Finalizado el paso de incubación se sedimentó la proteína G por centrifugación a 1600 *g* durante 2 minutos a 4°C y se hicieron dos lavados con tampón de IP y un último lavado con un tampón de baja concentración salina (de igual composición que el tampón de IP pero sin incluir NaCl ni Triton X-100). Tras ello, se resuspendió el precipitado en 30 µl de tampón de carga de electroforesis 2X, se hirvió durante 5 minutos y se sedimentó la proteína G por centrifugación a alta velocidad. Se cargó la totalidad del volumen obtenido en el sobrenadante y se analizaron los complejos de inmunoprecipitación mediante WB, empleando anticuerpos contra mGluR1 y mGluR5.

6. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE NSM2

La actividad de NSM en sinaptosomas se midió como la fluorescencia asociada a Resorufina, producto derivado de las reacciones que lleva a cabo esta enzima empleando el kit comercial de Cayman Chemical Company (Sphingomyelinase Fluorimetric assay kit, 10006964). En la figura se describe el esquema del ensayo. El protocolo indicado por la casa comercial se modificó ligeramente para adaptarlo a los extractos sinaptosomales. Brevemente, los sinaptosomas recién obtenidos se resuspendieron a 4°C en el tampón de ensayo proporcionado por el kit, a una concentración final de 1mg/ml. Las muestras se distribuyeron por triplicado en la placa del kit, así como la curva estándar de Fosforilcolina y los controles positivos de SMasa. Se añadió a todos los pocillos la solución de revelado conteniendo la mezcla de las enzimas fosfatasa alcalina, colina oxidasa, HRP (horseradish peroxidase) además de DMSO y el sustrato fluorimétrico de la SMasa, ADHP (10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) (**Figura M2**). Tras ello se añadió SM, proporcionada por el kit como sustrato para el inicio de la reacción, en todos los pocillos exceptuando aquéllos empleados como controles negativos. Tras cubrir la placa se incubó durante 30 minutos a 37°C y finalmente se detectó la señal fluorimétrica midiendo la emisión de las muestras tras excitar con una longitud de onda de 530-540 nm, empleando el fluorímetro FLUOstar optima (BMG LABTECH, GmbH, Otenberg, Alemania).

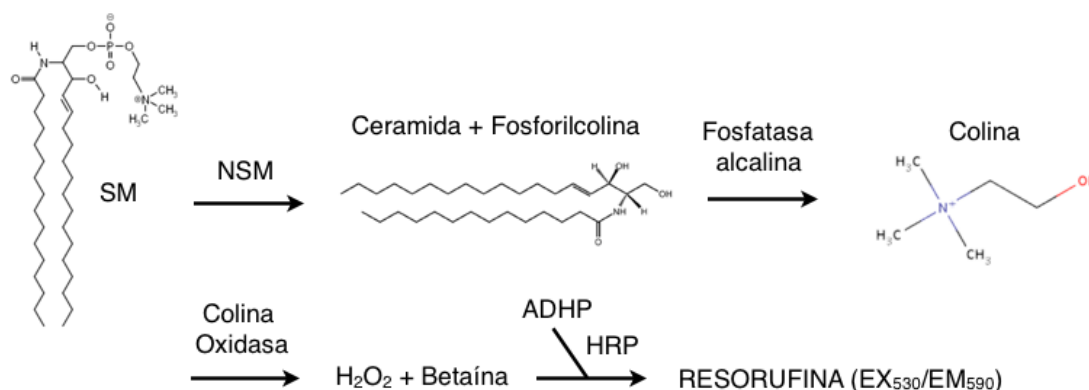


Figura M2: Esquema representativo de las reacciones enzimáticas para la determinación de la actividad de la NSM. NSM hidroliza la SM generando Ceramida y Fosforilcolina, que es hidrolizada por la Fosfatasa alcalina generando Colina. Mediante oxidación de la Colina se genera Betaína y H_2O_2 que en presencia de HRP reacciona con una razón estequiométrica 1:1 con ADHP generando el producto fluorescente Resorufina.

7. ANÁLISIS DE LÍPIDOS: CUANTIFICACIÓN DE SM MEDIANTE ENSAYO ENZIMÁTICO.

El protocolo empleado para muestras de membrana de extractos sinaptosomales fue ligeramente modificado a partir del descrito en Hojati & Jiang 2006, basado en la medida del lípido en plasma. Partimos de una curva estándar con concentraciones conocidas de SM (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EEUU) diluida en CHCl_3 y de extractos de membrana sinaptosomal (entre 9-15 μg de proteína) derivados de ratones ASM+/+ y ASM-/- en las diferentes condiciones y tratamientos. Tanto a las muestras de la curva patrón como a las biológicas, se les añadió el detergente Thesit (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, EEUU) a un 4% de concentración final.

Tras mezclar se secaron los tubos con nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos. Seguidamente se resuspendieron en 50 μl de H_2O destilada y se incubaron en el baño a 37°C durante 10 minutos, tras los cuales se añadió la mezcla de reacción conteniendo H_2O MilliQ, Tris HCl 50mM pH7.5, MgCl_2 0,5mM, COX (ciclooxigenasa) 1U/ml y HVA (homovanilic acid) 30mM.

La transformación de SM en colina mediante la SMasa se acopló a la producción de fluorescencia mediante la acción de la colina oxidasa, peroxidasa y el ácido homovanílico. Tras una hora de incubación a 37°C en oscuridad, la reacción se bloqueó mediante la adición de 1ml de tampón carbonato (0,5M Na_2CO_3 , 10mM EDTA pH10.7) y la fluorescencia se midió inmediatamente en un fluorímetro (Luminescence Spectrometer, AMINCO-Bowman Series 2) a unas longitudes de onda de 327_{excitación} / 420_{emisión}.

8. TRATAMIENTOS EN SINAPTOSOMAS

8.1 Estimulación con KCl 55mM.

Para los ensayos de inmunoprecipitación realizados establecimos las estimulaciones en sinaptosomas como describimos a continuación. Tras atemperar durante 15 minutos a 37°C las fracciones sinaptosomales recién obtenidas, se les añadió un tampón despolarizante (NaCl 90mM, Glucosa 10mM, MgSO₄ 2mM, CaCl₂ 2mM, HEPES 20mM pH 7.4) conteniendo KCl a una concentración final de 5mM o de 55mM para las fracciones control o estimuladas, respectivamente, como se describe en Sodero et al., 2012. La estimulación se mantuvo durante 10 minutos en agitación suave y tras este tiempo la reacción se bloqueó situando las muestras en hielo. Después se precipitaron los sinaptosomas con una centrifugación a baja velocidad y con el fin de eliminar el tampón de la estimulación, se lavaron con tampón Hepes modificado (apartado 4.2), se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en éste último tampón conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas.

8.2 Adición de SM y tratamiento con SMasa exógena.

Con el fin de obtener un incremento de los niveles de SM en la membrana sináptica las fracciones sinaptosomales derivadas de ratones ASM+/+ se atemperaron durante 15 minutos a 37°C y se les añadió una solución de SM en EtOH a una concentración final de 1,25mM. A las muestras control se les añadió el mismo volumen de EtOH. Las muestras se incubaron durante 45 minutos en agitación suave tras los cuales se paró la reacción en hielo y por centrifugación a baja velocidad. Las muestras se lavaron y se resuspendieron en tampón Hepes modificado como en el apartado anterior.

Para reducir los niveles de SM en sinaptosomas derivados de ratones ASM-/-, se trataron fracciones sinaptosomales recién obtenidas con 0,1 unidades/100µl de medio de SMasa exógena procedente del *Bacillus cereus* (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 1 hora, tiempo suficiente para reducir los niveles de SM en la membrana sinaptosomal en aproximadamente el 45%. Tras el tratamiento, los sinaptosomas se lavaron y resuspendieron como mencionamos anteriormente.

8.3 Tratamientos con 1α, 25-dihidroxitamina D₃ (VitD₃) y Dexametasona (DM).

Para reducir *in vitro* los niveles de SM mediante la activación de la NSM, partimos de fracciones sinaptosomales recién aisladas que tras atemperarse a 37°C durante 15 minutos, se trataron con VitD₃ y DM, ambos de Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, EEUU. Los compuestos se disolvieron en EtOH y se incubaron a una concentración final de 0,1µM durante 1 hora a 37°C y en ligera agitación. Las muestras control se

incubaron en las mismas condiciones con EtOH. Tras la hora de tratamiento se trasladaron las muestras a hielo y se centrifugaron a baja velocidad. La fracción sinaptosomal tratada en el sedimento se lavó con 1ml de tampón Hepes modificado conteniendo inhibidores de proteasas.

8.4 Tratamientos con antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Los sinaptosomas se trataron con el AINE Ibuprofeno. En concreto se utilizó la suspensión pediátrica Pirexin (Juventus Laboratories). El acondicionamiento previo de las muestras biológicas se realizó como describimos en los tratamientos anteriores y se incubaron durante diferentes tiempos (30 minutos, 45 minutos, 1 hora y 1 hora 30 minutos) con 1mg/ml de concentración final a 37°C en agitación suave. Tras finalizar los tiempos de incubación, los sinaptosomas se lavaron y resuspendieron de la misma forma que en los tratamientos descritos previamente.

9. TRATAMIENTOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES.

9.1 Tratamientos con SM y SMAse exógenas.

Los tratamientos para incrementar o reducir los niveles de SM en cultivos primarios de neuronas se realizaron como se describe en Galvan et al., 2008.

Para incrementar los niveles de SM en neuronas derivadas de ratones ASM+/+, éstas se mantuvieron en cultivo según el procedimiento indicado en el apartado 2.1 durante 9 días cuando se trataron con el lípido. Media hora antes del inicio del tratamiento, se añadió al medio de cultivo Na_2HPO_4 50mM, que inhibe la ASM (Testai et al., 2004). Transcurrido este tiempo, se incorporó al medio SM disuelta en EtOH a una concentración final de 40µM, mientras que se añadió al medio de las neuronas control la misma cantidad de EtOH, que no superó en ningún caso el 1% del volumen total del medio neuronal para evitar toxicidad.

En el caso de los cultivos neuronales derivados de ratones ASM-/-, y con el objetivo de reducir los niveles de SM, la SMAse bacteriana se añadió directamente al medio de neuronas de 9 días a una concentración de 0,1U/100µl de medio neuronal.

En ambos casos los tratamientos se mantuvieron durante 48 horas tras las que se lavaron las células con PBS y se fijaron con PFA 4% para su estudio por inmunofluorescencia.

9.2 Tratamientos con VitD₃ y DM.

Para la activación de la NSM en neuronas derivadas de embriones ASM-/-, éstas se mantuvieron en cultivo hasta los 15 DIV según el procedimiento explicado en el apartado 2.1. Se añadieron los compuestos VitD₃ y la DM (ambos de Sigma-Aldrich) a

una concentración de 0,1 μ M disueltos en EtOH a neuronas de 9 DIV. El tratamiento se añadió cada día al medio de cultivo hasta el día 15 *in vitro*, además de incluir una renovación parcial del medio neuronal en el día 12. Las neuronas control se trataron con el mismo procedimiento pero únicamente con EtOH. Transcurridos los tratamientos las neuronas se lavaron y fijaron para proceder con el protocolo de inmunofluorescencia descrito en 3.2.2.

10. TRATAMIENTOS ORALES CON DM E IBUPROFENO.

Los tratamientos en ratones ASM+/+ y ASM-/- comenzaron a la edad de un mes, inmediatamente después de ser destetados, dividiéndose los grupos de tratamiento según el sexo con 10 animales por condición. La DM se suministró disuelta en EtOH, en el agua de la bebida, a una concentración final de 1,5 μ g/ml. Considerando que el consumo medio de agua de un ratón al día es de 4 ml y que su peso medio es de 20 gr, estimamos que la dosis recibida es de aproximadamente 0,3 μ g/gr ratón/día. El EtOH se suministró a los grupos control de la misma forma, resultando en un consumo inferior a 5 μ l/ratón/día. Dada la sensibilidad lumínica del compuesto las botellas se cubrieron con papel de aluminio. Aún así las soluciones con DM y EtOH fueron renovadas cada tres días para asegurar su estabilidad y poder determinar más precisamente los volúmenes consumidos.

Paralelamente llevamos a cabo tratamientos orales con AINE, en concreto con una suspensión oral de ibuprofeno (Pirexin 20mg/ml, Juventus Laboratories) que fue suministrado en el agua de la bebida a una concentración de 1mg/ml como se describe en Ezell et al., 2012. Asimismo incluimos un grupo de tratamiento al que se suministró el ibuprofeno en el pienso a 0,375mg/g (material cedido amablemente por el laboratorio del Prof. Jesús Ávila) para descartar efectos de posibles trastornos digestivos. En este caso, se pesó el pienso al inicio de tratamiento, y se renovó la dosis cada 3 días, momento en el que se controló el peso para determinar la ingesta media.

Los tratamientos orales tuvieron una duración de 2,5 meses, momento en el que se evaluó el comportamiento mediante diferentes tests (ver a continuación) para después proceder al sacrificio de los ratones y el análisis bioquímico y por microscopía de sus cerebros como se indicó anteriormente.

11. TESTS DE COMPORTAMIENTO.

Para determinar si se daba una mejora en las capacidades motoras y de memoria de los ratones ASM-/- tras los tratamientos *in vivo* llevamos a cabo diferentes tests de comportamiento. Todos ellos se realizaron en una sala acondicionada para este fin donde los animales permanecieron al menos 5 días antes del ensayo.

11.1 Y-Maze

El test se desarrolló según se describe en Cognato et al., 2010. Brevemente, se empleó una estructura con forma de Y con paredes negras opacas de unos 8 cm de altura. En la primera parte del ensayo se permitió a los animales explorar 2 brazos de la estructura durante 8 minutos: el brazo 1 (el de inicio, elegido aleatoriamente) y otro adicional, mientras que el tercer brazo (el brazo nuevo) se mantuvo cerrado con una tapa evitando el paso de los animales. En la segunda prueba, los animales tuvieron acceso libre para la exploración en los 3 brazos durante 5 minutos. Medimos el tiempo empleado en la exploración del brazo nuevo calculando la capacidad de discriminación de la novedad espacial. Evaluamos de esta forma a hembras ASM+/, ASM-/- y ASM-/- tratadas con DM en grupos de 10 ratones por condición.

11.2 Polo vertical.

Este test se desarrolló como se describe en Ogawa et al., 1985. Se empleó una estructura constituida por una base con un polo vertical de superficie rugosa, de 55 cm de altura y 8 mm de diámetro. En una primera fase de habituación al test los ratones se situaron uno a uno en el extremo del polo mirando hacia la base y se les dejó descender hasta ella. Tras esperar un mínimo de 30 minutos se realizó una segunda ronda de habituación y tras ella los animales se situaron en el polo en orientación contraria a la utilizada anteriormente, es decir boca arriba. Calculamos el tiempo empleado por los ratones en orientarse hacia abajo y descender hasta la base en un tiempo máximo de 190 segundos. No consideramos en el recuento a aquellos animales que permanecieron inmóviles en el extremo del polo más allá de los 190 segundos. Evaluamos de esta forma a hembras ASM+/, ASM-/- y ASM-/- tratadas con DM en grupos de 10 ratones por condición.

12. MEDIDA DEL mRNA DE NSM2.

En este ensayo se emplearon córtex cerebrales derivados de ratones ASM-/- tratados oralmente o no con DM que fueron homogeneizados en 700µl de tampón de lisis (HEPES 5mM pH7.4, EDTA 1mM, Sacarosa 0,32M y 0,1% Tritón X-100). El homogenizado se mantuvo en hielo y se mezcló con 500µl de Trizol (Ambion/RNA. Life Technologies Co., Gran Island, New York, EEUU). La mezcla se incubó 20 minutos en hielo y tras ello se añadieron 200µl de CHCl_3 con los que se incubó nuevamente durante 10 minutos, esta vez a temperatura ambiente. Tras la centrifugación a 14000rpm durante 15 minutos se recuperó la fase acuosa de la superficie del tubo y se procedió a la precipitación de RNA de dicha solución empleando Glicógeno e Isopropanol durante 1 hora a -20°C. Tras centrifugar a 14000rpm durante 10 minutos el precipitado de RNA se lavó con EtOH, se secó y se resuspendió en 100µl de agua destilada libre de RNAsa (Qiagen, Hilden, Alemania). Las muestras se limpiaron para eliminar los

posibles restos de Trizol empleando columnas del Rneasy Mini Kit de Qiagen y se calculó la concentración de RNA en 1 µl de la solución estimada por la absorbancia a 260nm con un Nanodrop ND-100 (Thermoscientific; Thermo Fisher Scientific Inc.). Finalmente se realizó la retrotranscripción partiendo de 150ng de RNA iniciales, empleando el Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermoscientific. Los niveles del mRNA de NSM2 se detectaron mediante PCR cuantitativa (qPCR ó Real Time PCR) empleando GoTaq® qPCR Mix de Promega Co. (Madison, Wisconsin, EEUU). y el equipo ABI PRISM 7900 HT SDS (Applied Biosystems, Life Technologies Co.) así como el software SDSv2.4 para el diseño y análisis de la placa. Para la detección del mRNA de NSM2 empleamos los siguientes oligonucleótidos (SIGMA-Aldrich) del gen *SPMD3*:

Nsm2_fw: 5' GTTGTCCGGGGTACACACAT 3'

Nsm2_rv: 5' TGCTGGACACAAACGGTCT 3'

Los niveles del mensajero de NSM2 se normalizaron frente a los de otros tres genes, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT-1*, obtenidos en las mismas condiciones empleando primers específicos.

13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa IBM SPSS statistics y el análisis de datos mediante el test T de student de 2 colas para comparar medias de distribuciones normales. Los datos se representaron como la media \pm desviación estándar. Los valores P menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos y en las figuras estos valores se indican con asteriscos siendo * < 0,05; ** < 0,02; *** < 0,001.

En el caso del análisis de la coordinación motora, se empleó un test X^2 (chi cuadrado) y se representó mediante una gráfica de frecuencia acumulada. Igualmente, P valores inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. La ausencia de ASM provoca una reducción en el número y tamaño de las espinas dendríticas.

La observación de la reducción en el número de espinas dendríticas en el cortex de los ratones ASM-/- descrita en la introducción fue el punto de partida para esta tesis. El primer objetivo fue caracterizar este defecto en mayor detalle. Postulamos que aunque el número de espinas no se encontró significativamente reducido en el hipocampo el tamaño si podría verse afectado en esta y en otras áreas cerebrales. Para comprobarlo recurrimos a la microscopía electrónica de transmisión. De acuerdo con el análisisiis diolístico ya comentado (**Figura I8**) la microscopía electrónica en el stratum radiatum del CA1 hipocampal no reveló diferencias significativas en el número de sinapsis entre ratones ASM+/+ y ASM-/- (ASM+/+: $2,20 \pm 0,3$ sinapsis/ μm^3 ; ASM-/ -: $2,22 \pm 0,29$ sinapsis/ μm^3). Sin embargo el área de los compartimentos postsinápticos era significativamente más pequeña en ausencia de ASM (ASM+/+: $0,16 \pm 0,012 \mu\text{m}^2$; ASM-/ -: $0,09 \pm 0,009 \mu\text{m}^2$) (**Figura R1A**).

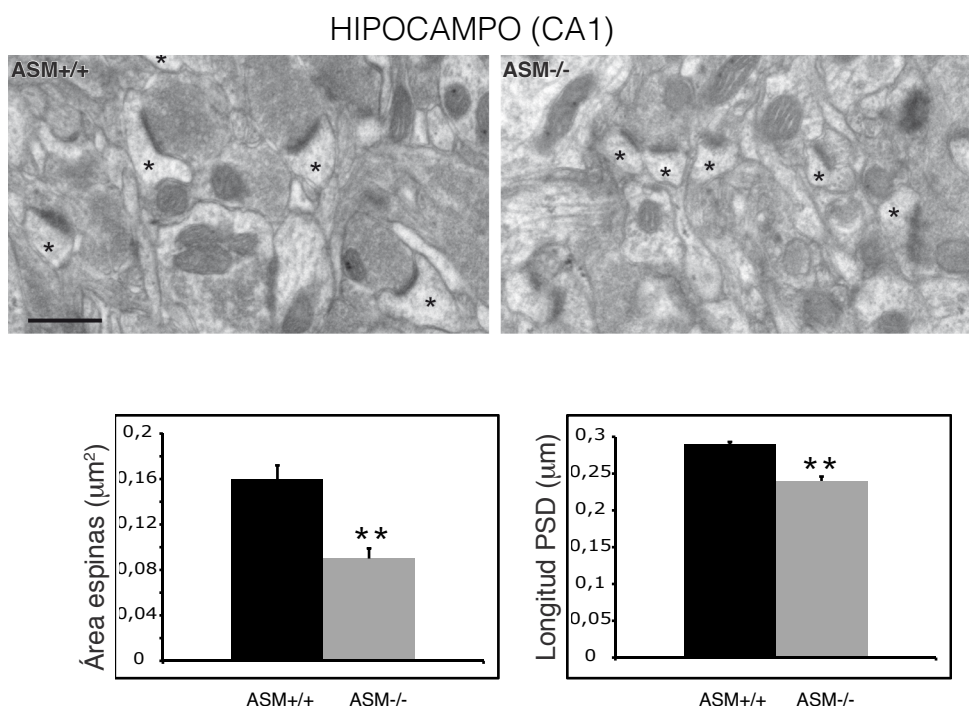


Figura R1A: Menor tamaño de las espinas dendríticas de neuronas del CA1 hipocampal en cerebros de ratones ASM-/- . Micrografías electrónicas de transmisión de las sinapsis del stratum radiatum del CA1 hipocampal de ratones ASM+/+ y ASM-/ -. Los asteriscos señalan las espinas dendríticas identificadas por la alta densidad electrónica que presenta el PSD en la región postsináptica y su contacto con la terminal presináptica que acumula vesículas. Barra de escala= 200 nm. Las gráficas muestran los valores medios y la desviación estándar del área de espinas en μm^2 ($p= 0,016$) y la longitud del PSD en μm ($p=0,006$) en ratones ASM+/+ y ASM-/ - ($n= 70$ sinapsis en cada uno de los 3 ratones analizados por genotipo).

Además medimos la longitud de la densidad postsináptica (PSD), segmento electrondenso en la superficie del compartimento postsináptico, que se relaciona con la madurez de las espinas (El-Husseini et al., 2000) y cuya longitud en neuronas hipocámpales es directamente proporcional al área de la espina dendrítica. En el hipocampo de ratones ASM^{-/-}, la longitud de la PSD es también menor que en el hipocampo ASM^{+/+} (ASM^{+/+}: $0,29 \pm 0,003 \mu\text{m}$; ASM^{-/-}: $0,24 \pm 0,006 \mu\text{m}$) (**Figura R1A**).

Las células de Purkinje del cerebelo son las neuronas más tempranamente afectadas en los cerebros ASM^{-/-} lo que lleva a la alteración en la coordinación motora (Horinouchi et al., 1995; Otterbach & Stoffel 1995). Por ello analizamos el tamaño de las espinas en esta región cerebral. El análisis por microscopía electrónica de la PSD en neuronas de la capa molecular, la más externa de la corteza cerebelosa donde las células de Purkinje extienden sus proyecciones dendríticas, reveló una menor longitud media en ratones ASM^{-/-} comparado con ratones ASM^{+/+} (ASM^{+/+}: $0,33 \pm 0,002 \mu\text{m}$; ASM^{-/-}: $0,27 \pm 0,002 \mu\text{m}$) (**Figura R1B**).

CEREBELO

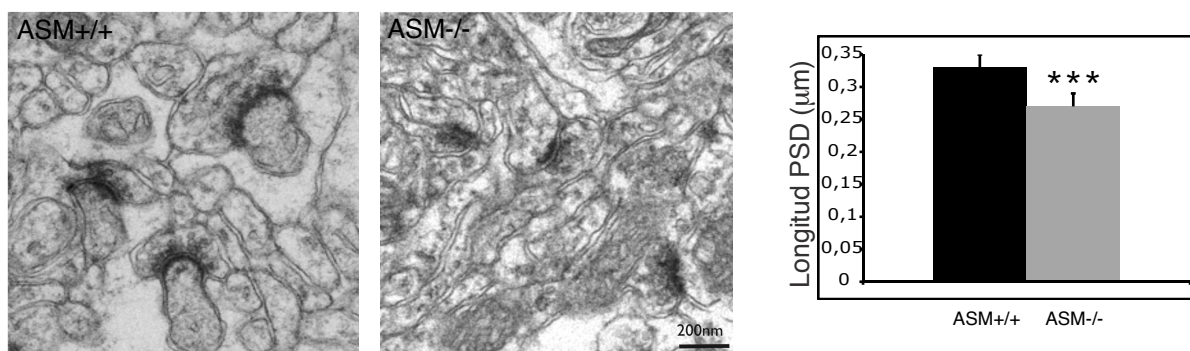


Figura R1B: Menor tamaño de las espinas dendríticas de células de Purkinje del cerebelo en ratones ASM^{-/-}. Micrografías electrónicas de transmisión de las sinapsis de la capa molecular del cerebelo de ratones ASM^{+/+} y ASM^{-/-}. Barra de escala= 200 nm. Las gráfica representa la media y la desviación estándar de la longitud del PSD en μm ($p= 0,0001$) en ratones ASM^{+/+} y ASM^{-/-} ($n= 70$ sinapsis en cada uno de los 3 ratones analizados por genotipo).

El análisis diolístico y de microscopía electrónica reflejan el impacto que la falta de ASM tiene en las espinas dendríticas de distintas poblaciones neuronales: desde la pérdida de espinas en la corteza somatosensorial hasta la reducción en su tamaño en el hipocampo y el cerebelo.

2. La ausencia de ASM disminuye la cantidad de actina polimerizada en espinas dendríticas debido a la acumulación de SM.

Nuestro siguiente objetivo fue profundizar en el mecanismo subyacente a la reducción en el tamaño de espinas dendríticas de ratones ASM^{-/-}. Un factor determinante del tamaño de las espinas dendríticas es la cantidad de actina polimerizada que contienen. Por ello comparamos los niveles de actina filamentosa (F-actina) en espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo de ratones ASM^{+/+} y ASM^{-/-}. Los niveles de F-actina se determinaron mediante tinción con Faloidina, una micotoxina producida por el hongo *Amanita phalloides*, que se une específicamente a los monómeros de actina constituyentes de los microfilamentos a los que estabiliza (Vandekerkhove et al., 1985). La unión de un fluoróforo como el TRITC (Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate) a esta toxina nos permitió cuantificar por microscopía de fluorescencia los niveles de F-actina en neuronas hipocampales en cocultivo con astrocitos durante 15 días *in vitro*, momento en el que las sinapsis se han establecido y madurado.

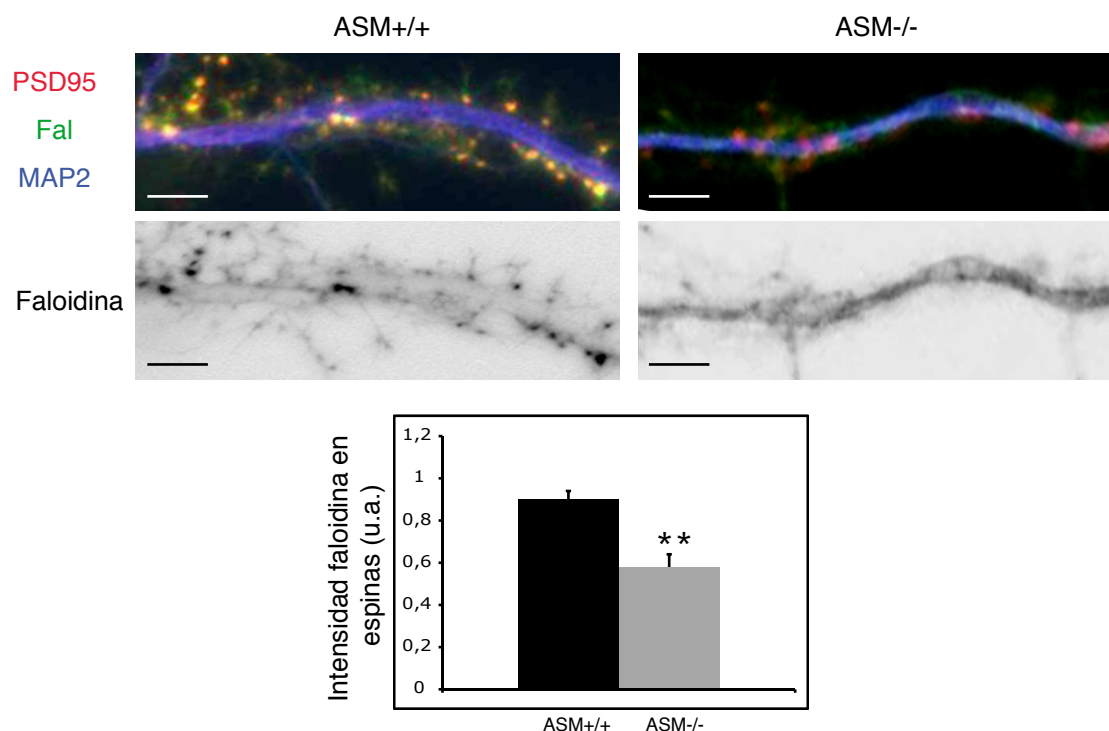


Figura R2A: Las espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo derivadas de ratones ASM^{-/-} presentan bajos niveles de F-actina. Imágenes representativas de segmentos dendríticos pertenecientes a neuronas hipocampales derivadas de ratones ASM^{+/+} y ASM^{-/-} con 15 DIV. Las neuronas se tiñeron con anticuerpos contra MAP2 (azul, marca específicamente el tronco de las dendritas), contra PSD95 (rojo, marcador enriquecido en espinas dendríticas) y faloidina (verde, que identifica la F-actina); los paneles inferiores muestran la tinción de faloidina en escala de grises. Barra de escala= 5 μ m. La gráfica cuantifica la intensidad de faloidina en espinas dendríticas como valor medio y desviación estándar por unidad de area (n= 250 espinas de 3 cultivos independientes; p=0,011).

Para definir con precisión las espinas dendríticas donde cuantificamos F-actina empleamos un co-marcaje con anticuerpos contra MAP2 (Microtubule- Associated Protein 2) que es un marcador específico del tronco de las dendritas y contra PSD95 que está enriquecida en el compartimento postsináptico. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a la faloidina por microscopía de fluorescencia, indicó que las espinas dendríticas ASM-/- tenían 1,55 veces menos F-actina que las ASM+/+ (**Figura R2A**).

Uno de los principales efectos de la ausencia de ASM-/- en neuronas es la acumulación de la SM tanto en la membrana plasmática (Galvan et al., 2008) como en membranas derivadas de la preparación de sinaptosomas que contienen compartimentos pre y postsinápticos (Camoletto et al., 2009). Quisimos determinar con mayor precisión si el aumento de los niveles de este lípido afectaba a la membrana postsináptica y si esto influía en la menor polimerización de actina. Con estos objetivos ampliamos el protocolo de purificación de sinaptosomas empleando pasos adicionales que permiten obtener una fracción enriquecida en postsinapsis (Schubert et al. 2006), ver materiales y métodos). Verificamos este punto mediante WB utilizando anticuerpos contra marcadores presinápticos como la sinaptofisina (Sy38, **Figura R2B**) que estaban ausentes de la fracción obtenida.

Mediante espectrometría de masas analizamos los niveles de SM, colesterol y fosfolípidos en fracciones postsinápticas de ratones ASM+/+ y ASM-/- de la misma edad (en colaboración con Paul Van Veldhoven (Universidad de Lovaina, Bélgica) (**Figura R2B**). El análisis indicó que mientras los niveles de fosfolípidos (ASM+/+: 35 ± 7 nmol/mg proteína; ASM-/=: 40 ± 4 nmol/mg proteína) y colesterol (ASM+/+: 287 ± 52 nmol/ μ mol fosfolípidos; ASM-/=: 225 ± 4 nmol/ μ mol fosfolípidos) no mostraron diferencias significativas entre ambos genotipos, la cantidad de SM era 2,5 veces mayor en las fracciones postsinápticas de cerebros ASM-/- comparadas con ASM+/+ (ASM+/+: 108 ± 21 nmol/ μ mol fosfolípidos; ASM-/=: 225 ± 21 nmol/ μ mol fosfolípidos).

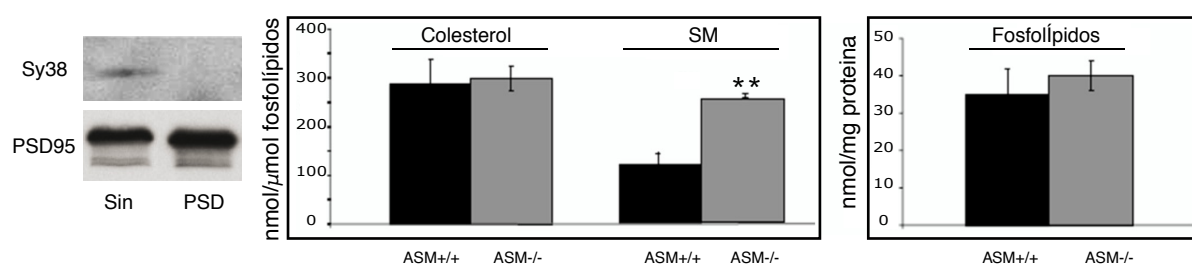


Figura R2B: Las membranas postsinápticas de neuronas ASM-/- presentan altos niveles de SM.

En el panel de la izquierda se muestra el Western Blot de marcadores pre y postsinápticos (Sy38 y PSD9, respectivamente) en extractos que contienen la misma cantidad de proteína, procedentes de una purificación de sinaptosomas totales (Sin) y de la fracción enriquecida en postsinapsis (PSD). Las gráficas cuantifican los niveles de fosfolípidos (en nmol/mg proteína) y de colesterol y SM (nmol/ μ mol fosfolípidos) en fracciones postsinápticas de ratones ASM+/+ y ASM-/- como valor medio y desviación estándar ($n=6$, $p_{SM} = 0,001$).

Para determinar si este aumento de los niveles de SM es responsable de los defectos en la polimerización de actina observados en las espinas dendríticas de neuronas ASM^{-/-}, añadimos este lípido durante 6 horas al medio de cultivo de neuronas hipocampales derivadas de ratones ASM^{+/+}. Este procedimiento asegura la incorporación del lípido a la membrana neuronal sin alterar los niveles de otros lípidos como el colesterol ni la viabilidad neuronal (ver materiales y métodos y Camoletto et al., 2008). Verificamos este punto en nuestros experimentos mediante un marcaje sin permeabilización con un fragmento de la toxina de lombriz, lisenina, que se une específicamente a SM y que puede ser identificado por un anticuerpo específico mediante inmunofluorescencia (Kiyokawa et al., 2004). De esta manera comprobamos que el tratamiento con SM exógena aumentaba en un 19% la cantidad de SM en la membrana plasmática de neuronas ASM^{+/+} (**Figura R2C**).

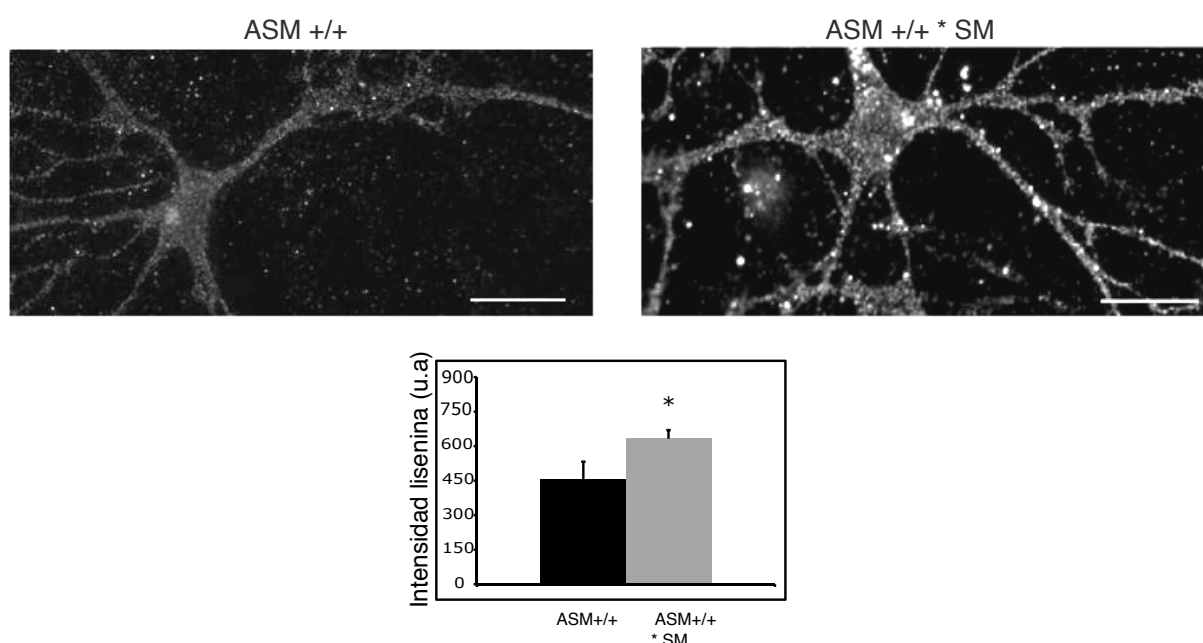


Figura R2C: Aumento de los niveles de SM en la membrana de neuronas hipocampales ASM^{+/+} en cultivo tras incubación con SM exógena. Imágenes representativas de la tinción con anticuerpos contra lisenina, que reconoce la SM, en neuronas de ratones ASM^{+/+} en cultivo tratadas o no con SM exógena a 40μM durante 6 horas. Barra de escala=100μm. La gráfica muestra en unidades arbitrarias, la media de intensidad de fluorescencia asociada a la lisenina y su desviación estándar por unidad de área (n=30 neuronas en 3 cultivos independientes (p=0,04).

En estas condiciones los niveles de F-actina, detectados en espinas dendríticas mediante triple tinción con faloidina-TRITC, anti MAP2 y anti PSD95, fueron 1,38 veces menores en comparación con las neuronas no tratadas (**Figura R2D**). De manera complementaria y para reforzar el papel de la SM en las deficiencias en la polimerización de actina, tratamos neuronas ASM^{-/-} con esfingomielinasa de *Bacillus cereus* (SMAasa). Añadida al medio de cultivo a una concentración de 0,1 unidades/100 μl a los 8 DIV y durante 48 horas redujo los niveles de SM en neuronas ASM^{-/-} hasta niveles similares a los encontrados en neuronas ASM^{+/+} sin afectar los niveles de otros

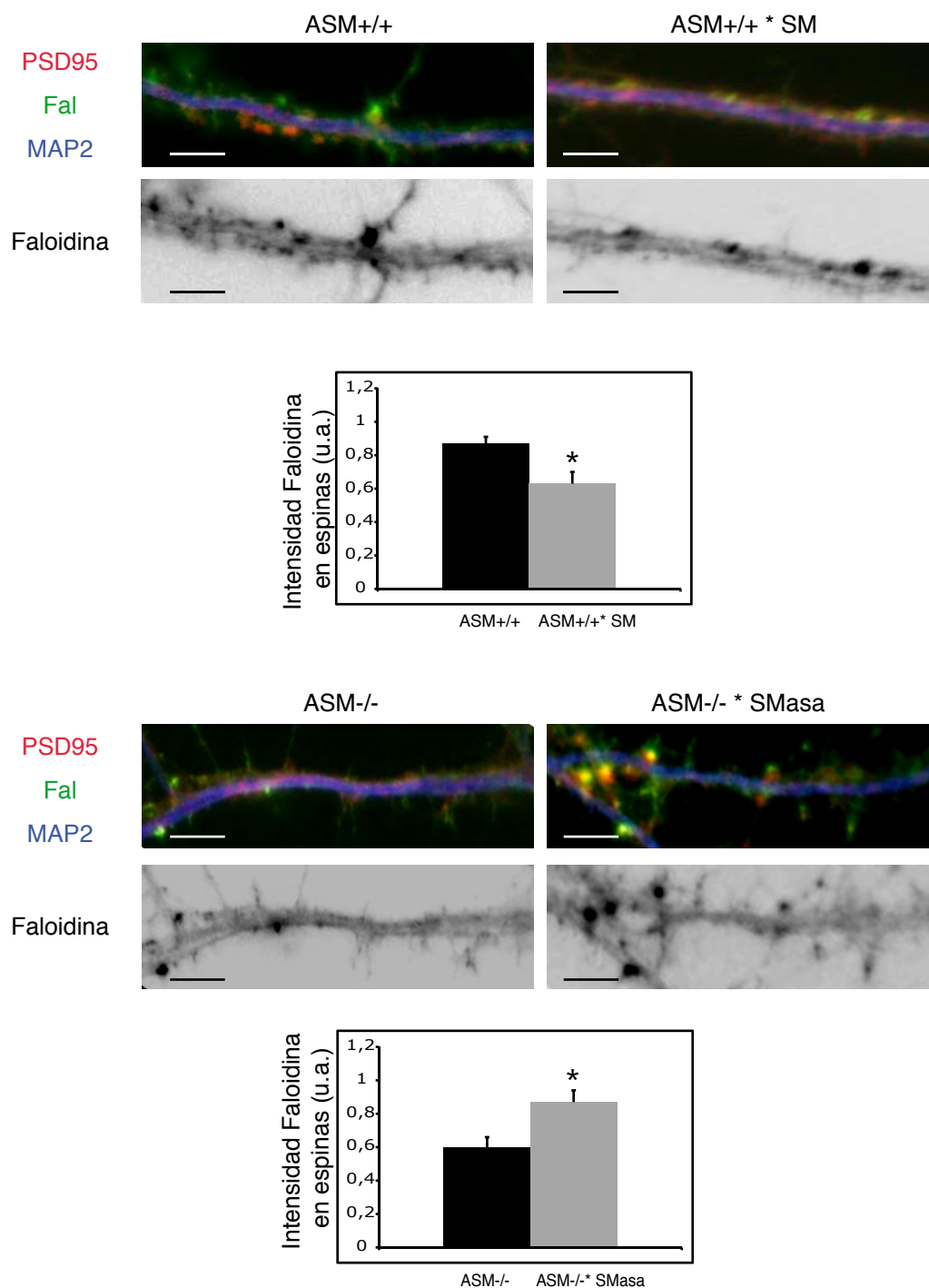


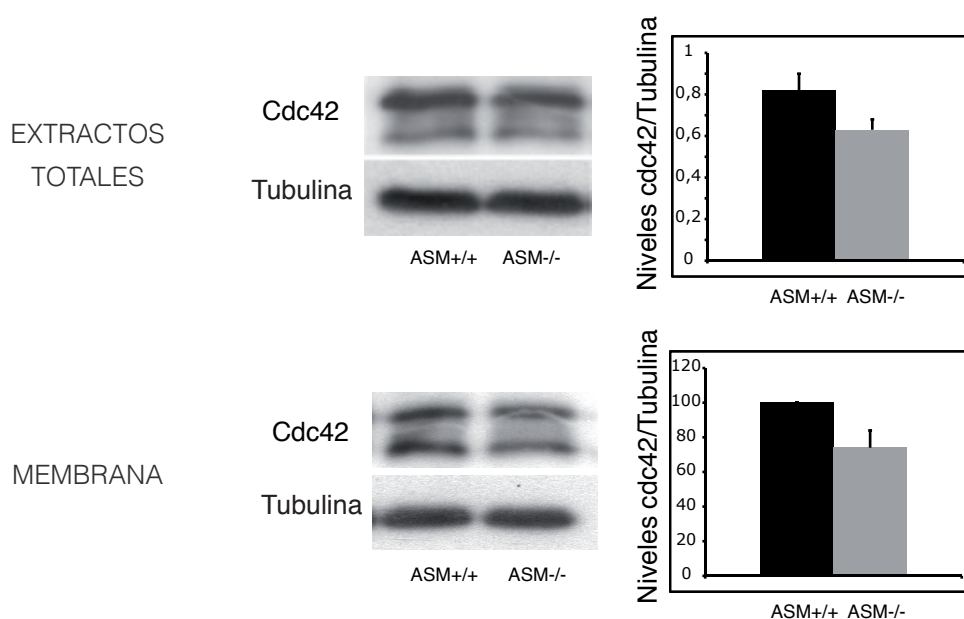
Figura R2D: La modulación de los niveles de SM afecta a la cantidad de F-actina en espinas dendríticas de neuronas hipocámpales en cultivo. Imágenes representativas de segmentos dendríticos de neuronas hipocámpales en cultivo de ratones ASM+/+ tratadas o no con SM (panel superior) o de ratones ASM-/- tratadas o no con Smase (panel inferior). Las neuronas se tiñeron con anticuerpos contra MAP2 (azul), contra PSD95 (rojo) y con faloidina (verde). Las imágenes en escala de grises muestran sólo la tinción de faloidina. Barra de escala= 5 μm. Las gráficas cuantifican la intensidad de faloidina en espinas dendríticas como valor medio y desviación estándar por unidad de área (n= 250 espinas de 3 cultivos independientes; $P_{ASM+/++SM} = 0,02$; $P_{ASM-/- + SMasa} = 0,03$).

lípidos ni provocar toxicidad celular (ver materiales y métodos y Galvan et al., 2008). La intensidad de fluorescencia asociada a la faloidina en espinas de neuronas ASM^{-/-} incrementó 1,45 veces en estas condiciones siendo comparable a la de neuronas ASM^{+/+} (**Figura R2D**).

En conjunto estos resultados indican una relación directa entre la acumulación de SM y la deficiente polimerización de actina en espinas dendríticas. Además sugieren que los bajos niveles de F-actina podrían ser la causa del menor tamaño de las espinas dendríticas en ratones ASM^{-/-}.

3. El aumento de SM reduce la unión a la membrana y la actividad de RhoA y sus proteínas efectoras en sinaptosomas de ratones ASM^{-/-}.

Las GTPasas de la familia Rho como RhoA, Rac1 y Cdc42 son consideradas, entre otros factores, importantes reguladores del citoesqueleto de actina en espinas dendríticas (Tada & Sheng, 2006; Hall, 1998). Numerosas evidencias confirman su participación en la formación y/o el mantenimiento de estas estructuras. Las GTPasas regulan su función pasando de un estado inactivo ligado a ADP a otro activo ligado a ATP. Para activarse deben unirse a la membrana lo que a su vez desencadena la activación de proteínas efectoras que en último término influyen en la polimerización de la actina (Buchsbbaum, 2007). Por ello postulamos que la alteración de los niveles de SM en la membrana plasmática observada en condiciones ASM^{-/-} podría alterar la unión, y por tanto activación, de estas GTPasas. Para comprobar esta hipótesis analizamos los niveles totales de estas proteínas así como la cantidad unida a membrana en sinaptosomas procedentes de ratones ASM^{+/+} y ASM^{-/-} de 4 meses de edad. No encontramos cambios en los niveles totales ni en la unión a membrana de Cdc42 y Rac1 (**Figura R3A**).



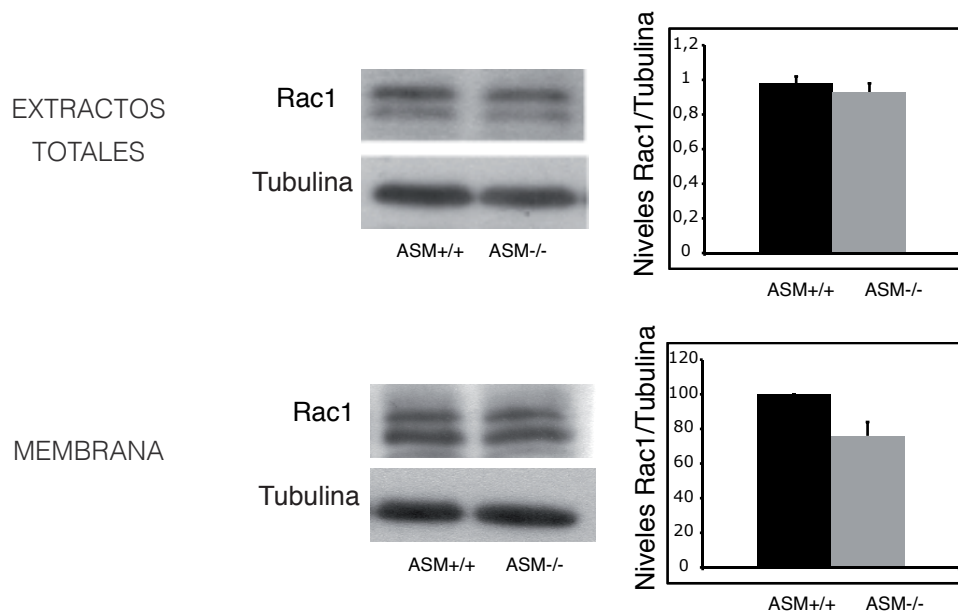


Figura R3A: La cantidad total y unida a membrana de cdc42 y Rac1 no está alterada en sinaptosomas ASM^{-/-}. WB de Cdc42, Rac1 y tubulina en extractos totales y de membrana de sinaptosomas ASM^{+/+} y ASM^{-/-}. Los gráficos cuantifican la media y la desviación estándar de los niveles de Cdc42 y Rac1 normalizados frente a tubulina. Para los extractos de membrana los valores de ASM^{-/-} se consideraron 100% (n=3).

Sin embargo se observó una reducción del 28% en los niveles totales de RhoA en los sinaptosomas ASM^{-/-}. Esta reducción fue aún más evidente (51%) en la cantidad de RhoA que se une a la membrana sinaptosomal (**Figura R3B**).

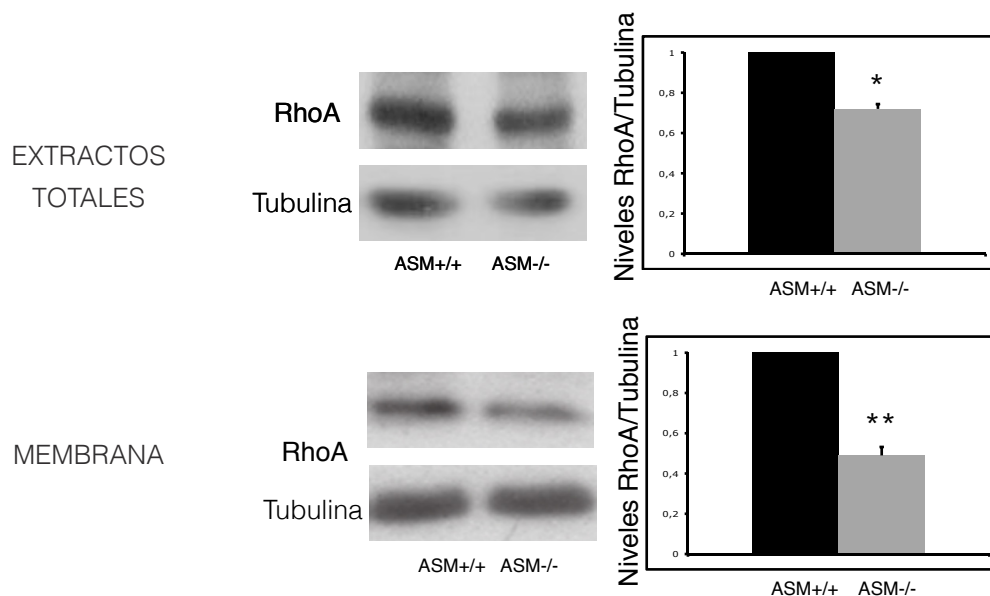


Figura R3B: La cantidad total y unida a membrana de RhoA está disminuida en sinaptosomas ASM^{-/-}. Western blots de RhoA y tubulina en extractos totales y de membrana de sinaptosomas ASM^{+/+} y ASM^{-/-}. Los gráficos cuantifican la media y la desviación estándar de los niveles de RhoA normalizados frente a tubulina y referidos a los niveles en ASM^{+/+} que se consideraron como 1 (n=3; $P_{\text{RhoA total}} = 0,04$; $P_{\text{RhoA membrana}} = 0,008$).

Para comprobar si la deficiente unión de RhoA a la membrana ASM^{-/-} se traduciría en una menor actividad de la GTPasa llevamos a cabo un ensayo in vitro de unión a Rotequina, (experimento realizado en colaboración con Paola G. Camoletto) factor que secuestra la forma activa de RhoA (Fu et al., 2000). Pudimos verificar que esta unión es un 38% menor en sinaptosomas ASM^{-/-} en comparación con sinaptosomas ASM^{+/+} (**Figura R3C**).

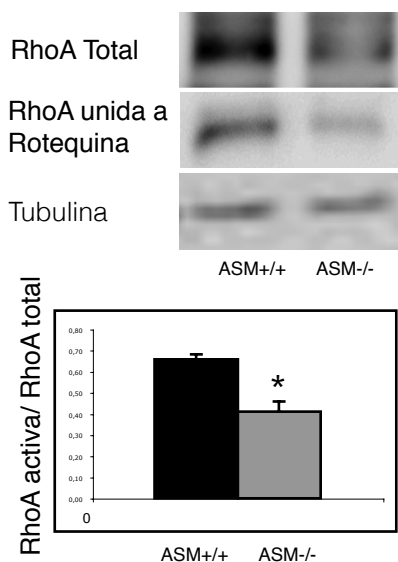
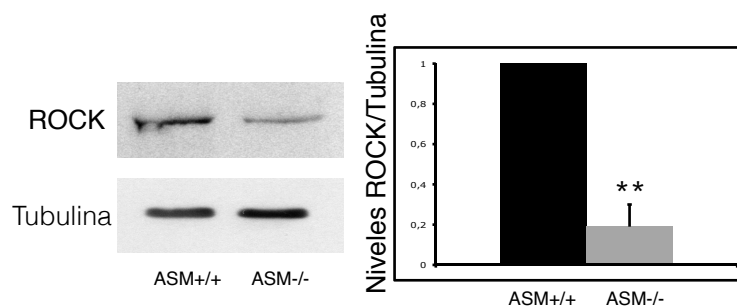


Figura R3C: La actividad de RhoA está reducida en sinaptosomas ASM^{-/-}. Western blots de RhoA total, RhoA unida a Rotequina y tubulina en sinaptosomas ASM^{+/+} y ASM^{-/-}. Las gráfica cuantifica la media y la desviación estándar del cociente RhoA activa (unida a Rotequina) respecto a RhoA total (n=3; p=0,025).

Como ya se ha comentado RhoA ejerce su influencia en el citoesqueleto de actina de manera indirecta mediante diferentes proteínas efectoras. Se ha descrito que en espinas dendríticas esta GTPasa activada promueve la estabilización de los filamentos de actina a través de ROCKII y de su efector neuronal PIIa (Schubert et al., 2006). Ensayos de WB en extractos de membrana sinaptosomal de ratones ASM^{+/+} y ASM^{-/-} evidenciaron que la cantidad de ambas proteínas, ROCKII y PIIa, unida a membrana disminuye significativamente en ausencia de ASM (81% y 68%, respectivamente) (**Figura R3D**).



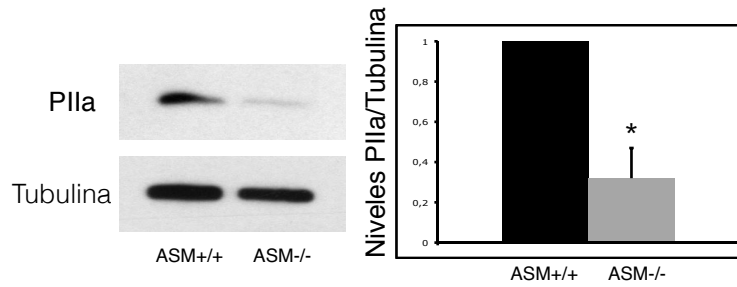
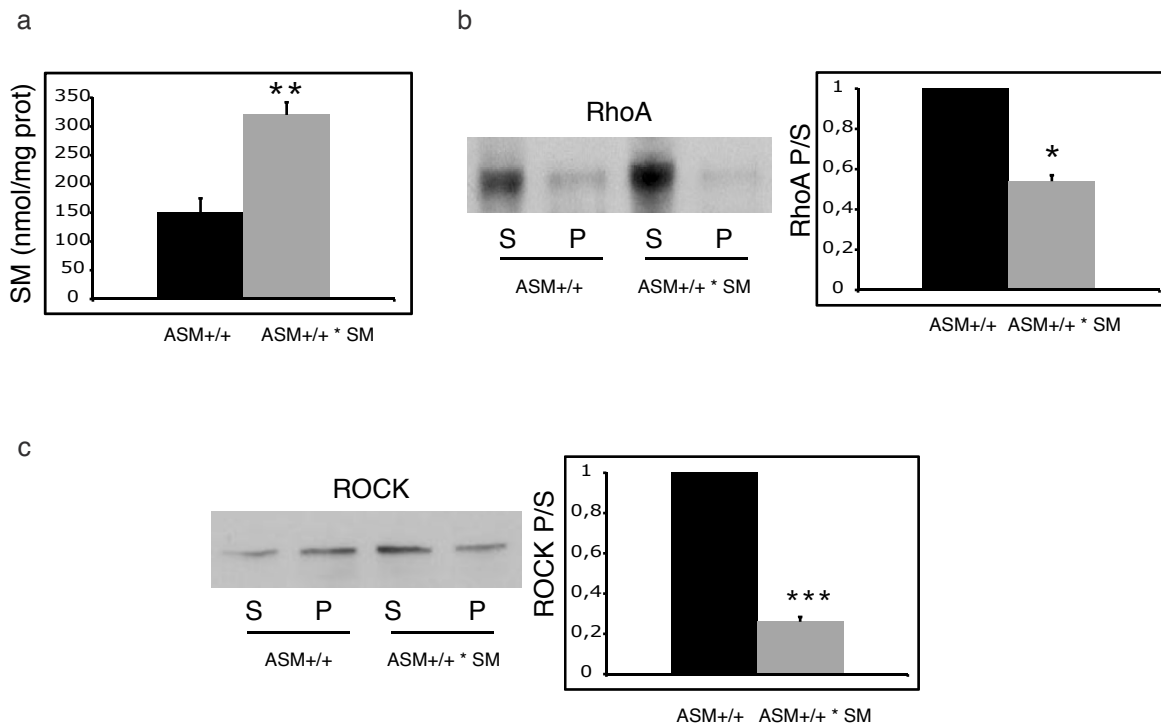


Figura R3D: La cantidad de los efectores de RhoA, ROCK y PIIa, está reducida en sinaptosomas ASM-/-. Western blots de ROCKII, PIIa y tubulina en extractos de membrana de sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/-. Las gráficas cuantifican la media y desviación estándar de los niveles de ROCKII ($p=0,017$) y PIIa ($p=0,033$) normalizados frente a tubulina y respecto a los valores obtenidos en ASM+/+ que se consideraron como 1 ($n=3$).

Para comprobar si las alteraciones en la cascada de señalización de RhoA en sinaptosomas ASM-/- era debida a los altos niveles de SM, añadimos el lípido a sinaptosomas de ratones ASM+/+. La incubación con SM exógena a 100µg/ml durante 1 hora, incrementó 2,1 veces los niveles del lípido en la membrana sinaptosomal alcanzando niveles similares a los encontrados en las membranas sinaptosomales de ratones ASM-/- (**Figura R3E.a**). En estas condiciones la unión a la membrana de RhoA, ROCKII y PIIa se redujo un 46%, 79% y 31%, respectivamente (**Figura R3E. b, c, d**).



d

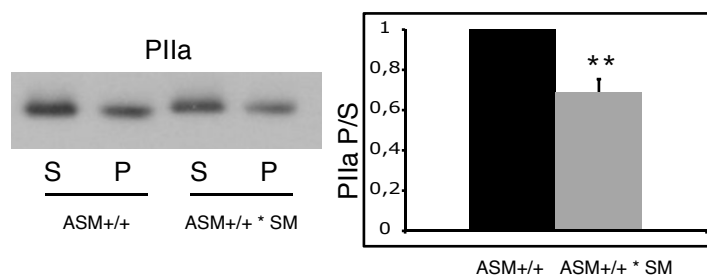


Figura R3E: El incremento de SM en sinaptosomas ASM+/+ reduce la unión a membrana de RhoA y sus efectores, ROCKII y PIIa. **a.** Niveles de SM (nmol/mg proteína) determinados mediante ensayo fluorimétrico en sinaptosomas ASM+/+ no tratados o tratados con 100µg/ml de SM exógena durante una hora. (n=3; p=0,019). **(b, c, d):** WB de RhoA **(b)**, ROCKII **(c)** y PIIa **(d)** en sobrenadantes (s, fracción citosólica) y pellets (p, fracción de membrana) obtenidos tras la centrifugación a 100000 g de sinaptosomas ASM+/+ tratados o no con SM. Las gráficas cuantifican la media y la desviación estándar para cada proteína expresadas como el cociente P/S (n=3; $P_{\text{RhoA}^* \text{SM}} = 0,029$; $P_{\text{ROCKII}^* \text{SM}} = 0,0009$; $P_{\text{PIIa}^* \text{SM}} = 0,008$).

Para confirmar la implicación de la SM en la defectuosa unión amembrana de RhoA en sinaptosomas ASM-/-, tratamos estos últimos con SMasa. La incubación con 0,1 unidades/100µl de medio durante 1 hora redujo los niveles de SM hasta 3 veces. En estas condiciones la unión de RhoA a membrana se incrementó 4,5 veces (**Figura R3F**).

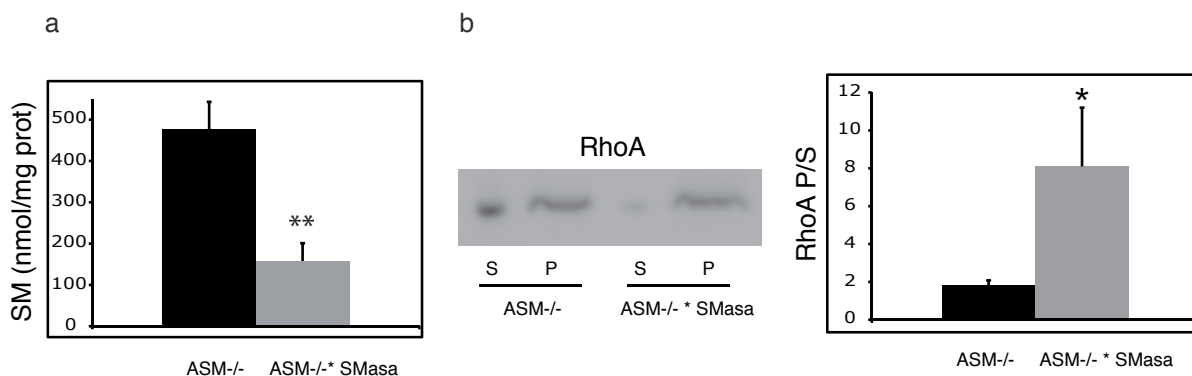


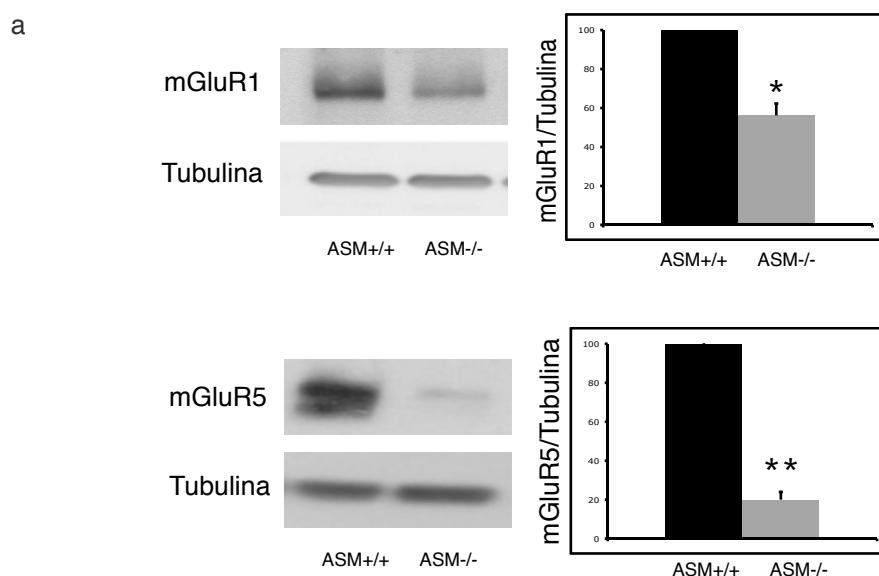
Figura R3F: El tratamiento de sinaptosomas ASM-/- con SMasa reduce los niveles de SM y restablece la unión a la membrana de RhoA. **a.** La gráfica cuantifica la media y la desviación estándar de los niveles de SM en nmol/mg proteína en sinaptosomas ASM-/- tratados o no con SMasa (n=3; p=0,016). **b.** WB de RhoA en sobrenadantes (S, fracción citosólica) y precipitados (P, fracción de membrana) obtenidos tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas ASM-/- tratados o no con SMasa. La gráfica cuantifica la media y la desviación estándar del cociente P/S de RhoA (n=3; p=0,032).

En conjunto estos resultados demuestran la influencia que los niveles de SM de la membrana sináptica ejercen sobre la señalización mediada por RhoA y sus efectores ROCK y Pfla, que son reguladores de la polimerización de actina en espinas dendríticas (Schubert et al., 2006). La deficiente activación de la vía de RhoA inducida por el incremento de la cantidad de SM en la membrana sináptica podría explicar la falta de polimerización de las espinas dendríticas de neuronas ASM-/-.

4. Los niveles de mGluR1/5 y su interacción con RhoA están reducidos en los sinaptosomas ASM-/-.

RhoA puede asociarse a la membrana postsináptica en espinas dendríticas a través de su interacción con los mGluRs de tipo I: mGluR 1 y 5. Esta interacción se acentúa tras el estímulo sináptico (Schubert et al., 2006). Los receptores mGluR1/5 se localizan en dominios de membrana ricos en colesterol y SM (Francesconi et al., 2009), cuya composición está alterada en las membranas neuronales de ratones ASM-/-. (Galvan et al., 2008). Por ello, postulamos que alteraciones en estos receptores contribuirían al menor anclaje de RhoA que encontramos en la membrana sináptica ASM-/-, afectando así a la actividad de la GTPasa.

Para comprobar esta hipótesis medimos por WB con anticuerpos específicos los niveles de mGluR1 y mGluR5 en membrana de sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/-. Los niveles de ambos receptores estaban reducidos en ausencia de ASM, en un 43% y 80%, respectivamente (**Figura R4A.a**). Además pudimos verificar que esta reducción se debe a la acumulación de SM en la membrana sináptica, ya que la adición de este lípido a sinaptosomas ASM+/+ redujo los niveles de mGluR1 y de mGluR5 en un 29% y 39%, respectivamente, en comparación con los sinaptosomas ASM+/+ no tratados (**Figura R4A.b**)



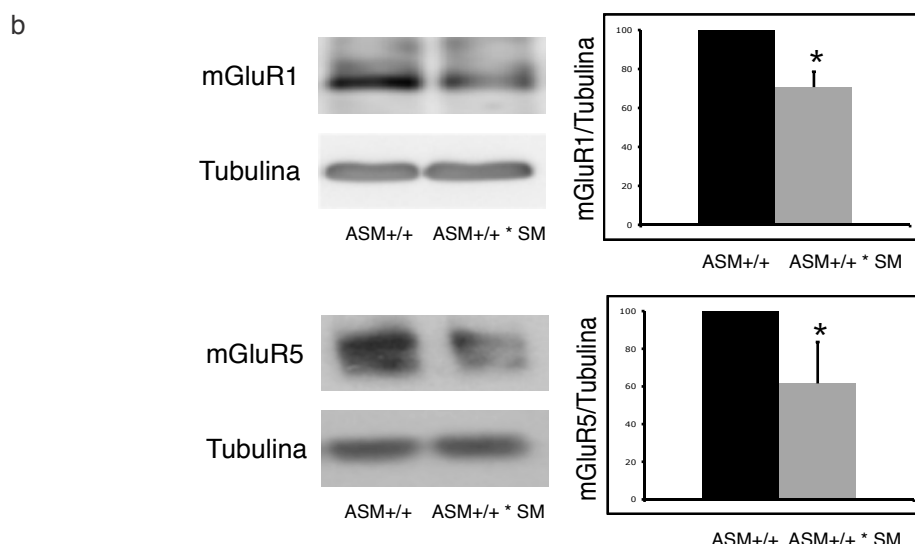
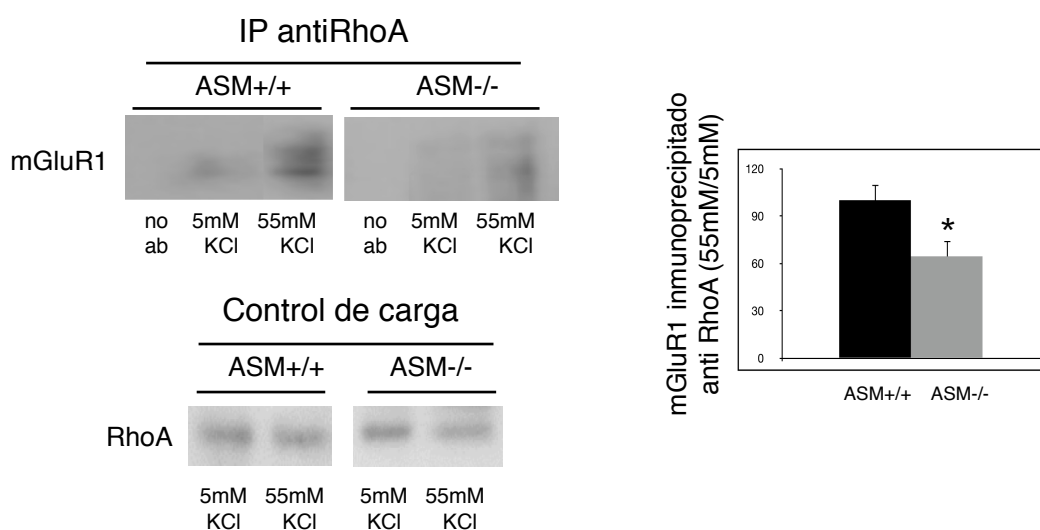


Figura R4A: Los niveles de mGluR1 y mGluR5 están reducidos en sinaptosomas de ratones ASM-/- debido al incremento de SM. Western blot de los niveles de mGluR1/5 y tubulina en extractos de membrana de sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/- (a) y en sinaptosomas ASM+/+ y ASM+/+*SM (b). Las gráficas cuantifican la media y la desviación estándar de los niveles de mGluR1/5 normalizados frente a tubulina y con respecto a los valores obtenidos en condiciones ASM+/+ que se consideraron 100% (n=3; $P_{\text{mGluR1 ASM-/-}} = 0,031$; $P_{\text{mGluR5 ASM-/-}} = 0,02$; $P_{\text{mGluR1 ASM+/+ * SM}} = 0,034$; $P_{\text{mGluR5 ASM+/+ * SM}} = 0,041$).

Para determinar si la reducción en los niveles de mGluR1 y mGluR5 se reflejaba en una menor interacción con RhoA realizamos ensayos de inmunoprecipitación en sinaptosomas estimulados con 55mM KCl durante 3 minutos. Observamos que mientras que los sinaptosomas ASM+/+ responden al estímulo incrementando la interacción entre la GTPasa y mGluR1 y 5 (2,5 y 2,3 veces, respectivamente), este incremento es menor en las estimulaciones realizadas en sinaptosomas ASM-/- (1,3 y 1,5 veces, respectivamente) (**Figura R4B**).



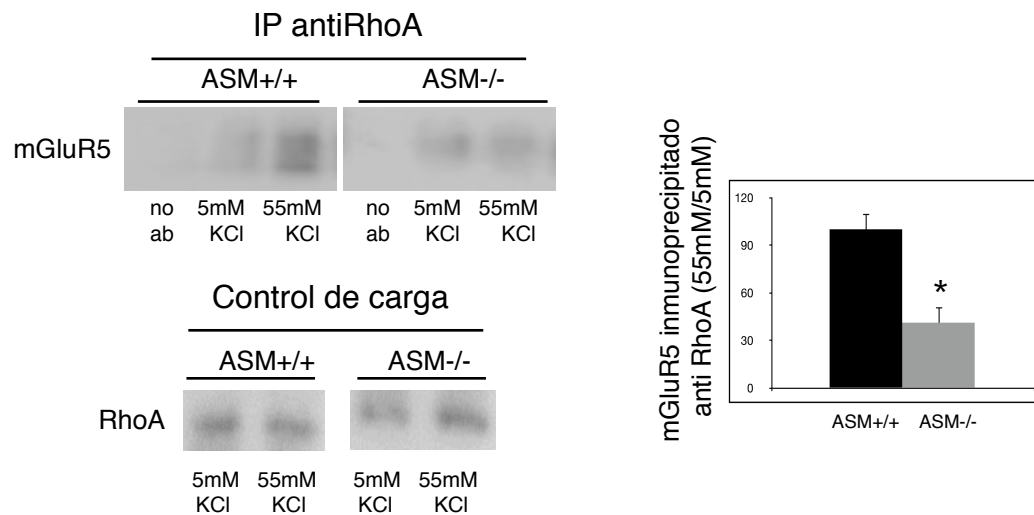


Figura R4B: La interacción entre mGluR1 y mGluR5 con RhoA está disminuida en sinaptosomas de ratones ASM-/-. Niveles de interacción entre mGluR1 y mGluR5 con RhoA, determinados mediante inmunoprecipitación, empleando el anticuerpo frente a RhoA en sinaptosomas ASM+/+ o ASM-/- tratados o no con KCl 55mM. Se comprobó la especificidad del ensayo empleando extractos no incubados con anti-RhoA (no ab). Los controles de carga muestran la cantidad de RhoA presente en las muestras utilizadas. Las gráficas cuantifican la media y desviación estándar de la cantidad de mGluR1/5 inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-RhoA ($n=3$; $P_{\text{mGluR1}}=0,04$; $P_{\text{mGluR5}}=0,023$).

De acuerdo con estas observaciones, el ensayo de unión a Rotequina (experimento realizado en colaboración con Paola G. Camoletto) reveló que la actividad de RhoA aumentaba 1,3 veces en sinaptosomas ASM+/+ estimulados con 55mM KCl con respecto a los no estimulados. Sin embargo, la activación inducida por estímulo no tuvo lugar (0,75 veces respecto a la situación basal) en los sinaptosomas ASM-/- (**Figura R4C**).

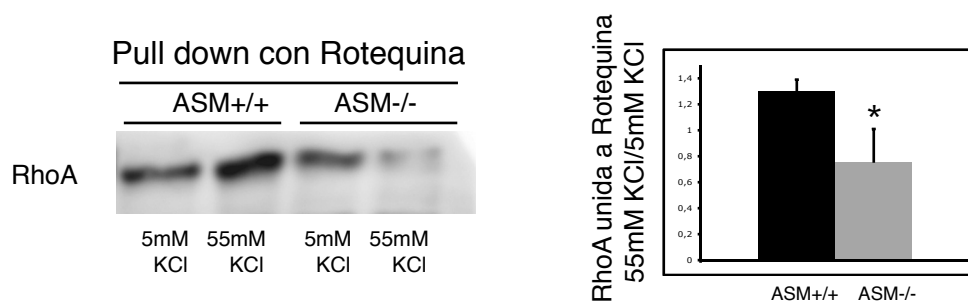


Figura R4C: La actividad de RhoA no se incrementa en respuesta a estímulo en sinaptosomas ASM-/-. Cambios en la actividad de RhoA en sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/- estimulados o no con 55KCl, determinados por la unión a Rotequina. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar de la activación de RhoA tras estímulo expresada como el cociente de la cantidad de RhoA unida a Rotequina en sinaptosomas estimulados por incubación con 55mM KCl y sin estimular incubados con 5mM KCl en sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/- ($n=3$; $p=0,035$).

El conjunto de estos resultados demuestra que el incremento de SM provoca una reducción de los niveles de mGluRsl lo que disminuye su interacción con RhoA y por tanto la unión a membrana y actividad de esta GTPasa en sinaptosomas ASM-/-.

5. La reducción de los niveles de SM mediante la activación de NSM restablece in vitro el anclaje de RhoA a la membrana y los niveles de F-actina en las sinapsis ASM-/-.

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que la acumulación de SM en la membrana sináptica es responsable de la deficiente activación de la vía de RhoA-ROCK-PfIIa lo que provocaría una menor polimerización de actina en las espinas dendríticas. Nuestro siguiente propósito fue demostrar esta contribución, además de buscar estrategias para revertir las anomalías encontradas en las espinas que carecen de ASM. Como se mencionó en la introducción, la NSM es la principal responsable de la hidrólisis de SM en la membrana plasmática neuronal (Stoffel, 1999) además de participar en procesos de plasticidad sináptica (Wheeler et al., 2009). Por otro lado, el gen que codifica para esta esfingomielinasa no está afectado en ratones ASM-/-. aunque se ha descrito una reducción en la actividad de esta enzima (Horinouchi et al., 1995). Por todo ello postulamos que NSM podría regular los niveles de SM en la sinapsis y que su activación, que disminuiría la cantidad de SM en membranas sinápticas, podría revertir las anomalías encontradas en espinas dendríticas de neuronas ASM-/-. Para demostrar esta hipótesis analizamos primero por WB los niveles de NSM en sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/-. encontrando niveles totales y de membrana muy similares (**Figura R5A**).

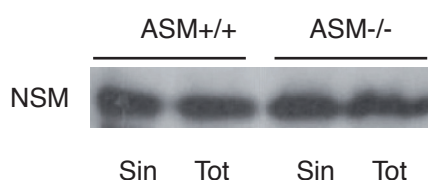


Figura R5A: La NSM2 está presente en cantidades similares en sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/-.

WB de los niveles de NSM en fracciones totales (Tot) o sinaptosomales (Sin) derivados de cerebros de ratones ASM+/+ o ASM-/-. conteniendo la misma cantidad de proteína.

Con el fin de promover la hidrólisis de SM en la membrana sináptica, empleamos dos compuestos, la 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ (VitD₃) y el glucocorticoide sintético dexametasona (DM), cuya capacidad para aumentar la actividad de la NSM se había descrito en células no neuronales (Okazaki et al., 1989, 1994; Ramachandran et al., 1990). Tratamos sinaptosomas derivados de cerebros ASM-/-. con VitD₃ o DM a una concentración de 0,1 μ M durante 1 hora a 37°C. La medición de SM mediante ensayo fluorimétrico reveló una disminución de la cantidad de este lípido de un 25% y 41% tras los tratamientos realizados con VitD₃ y DM, respectivamente (**Figura R5B**).

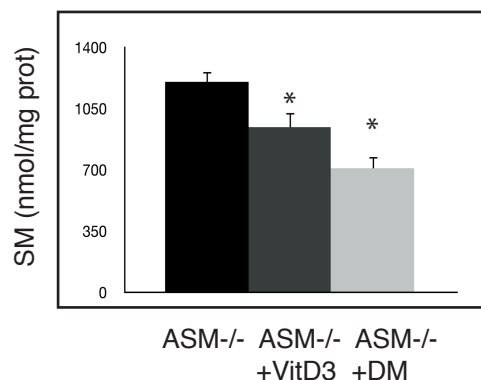


Figura R5B : Los tratamientos con VitD₃ y DM disminuyen la cantidad de SM en sinaptosomas de ratones ASM-/-. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar de los niveles de SM en nmol/mg proteína en sinaptosomas ASM-/- tratados o no con VitD₃ y DM (n=3; $P_{\text{VitD}_3}=0,04$; $P_{\text{DM}}=0,033$).

En los tratamientos realizados con DM pudimos confirmar un aumento de los niveles de proteína NSM (30%) y de su actividad (15%) (**Figura R5C**). El tratamiento con VitD₃ incrementó los niveles de proteína NSM en un 17% aunque no de manera significativa.

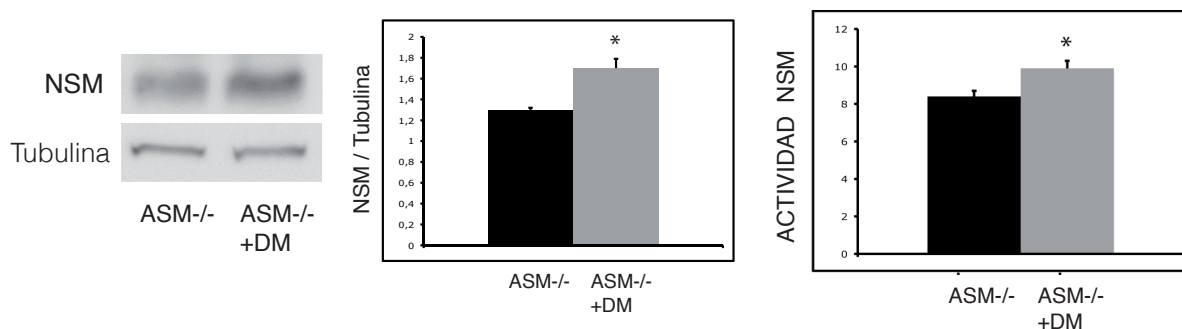


Figura R5C : El tratamiento con DM aumenta los niveles de proteína de la NSM y su actividad en sinaptosomas de ratones ASM-/-. WB de los niveles de NSM y de tubulina en sinaptosomas ASM-/- tratados o no con DM. La gráfica central cuantifica la media y la desviación estándar de los niveles de NSM normalizados respecto a tubulina (n=3; $P=0,025$). La gráfica a la derecha cuantifica la media y la desviación estándar de la actividad de NSM en unidades arbitrarias en sinaptosomas ASM-/- tratados o no con DM (n=3; $P=0,032$).

Una vez comprobada la capacidad de los compuestos para reducir la cantidad de SM en sinaptosomas ASM-/-, determinamos si los tratamientos tenían efecto en la unión de RhoA a la membrana. WB con anticuerpos contra RhoA de fracciones citosólicas o de membrana de sinaptosomas ASM-/- tratados o no con VitD₃ y DM revelaron un incremento de 1,98 y 4 veces, respectivamente, en la cantidad de RhoA asociada a la membrana (**Figura R5D**).

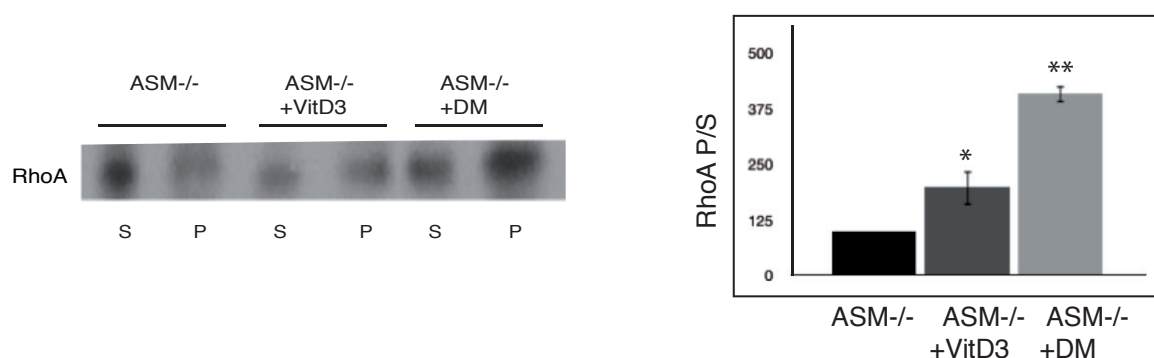


Figura R5D: Los tratamientos con VitD₃ y DM aumentan la unión a membrana de RhoA en sinaptosomas de ratones ASM-/-. WB de los niveles de RhoA en fracciones citosólicas (S) y de membrana (P) tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas ASM-/- tratados con VitD₃ y DM. Los gráficos cuantifican la media y desviación estándar del cociente P/S de RhoA en las muestras tratadas expresadas en porcentaje respecto al mismo cociente en ASM+/+, considerado como el 100% (n=3; P_{VitD3}=0,042; P_{DM}=0,001).

Para evaluar el efecto de la reducción de SM mediante la activación de NSM en la polimerización de actina, tratamos neuronas hipocampales derivadas de ratones ASM-/- con 0,1 μ M VitD₃ o DM. Comenzamos los tratamientos a los 9 DIV hasta los 15 DIV, momento en el que las sinapsis han alcanzado madurez en los cultivos primarios y las espinas dendríticas son evidentes. Mediante tinción con Faloidina y comarceaje con MAP2 y PSD95 confirmamos que los tratamientos con VitD₃ y DM incrementaban los niveles de F-actina en un 39% y 117%, respectivamente, en las espinas de neuronas hipocampales de ratones ASM-/- (**Figura R5E**).

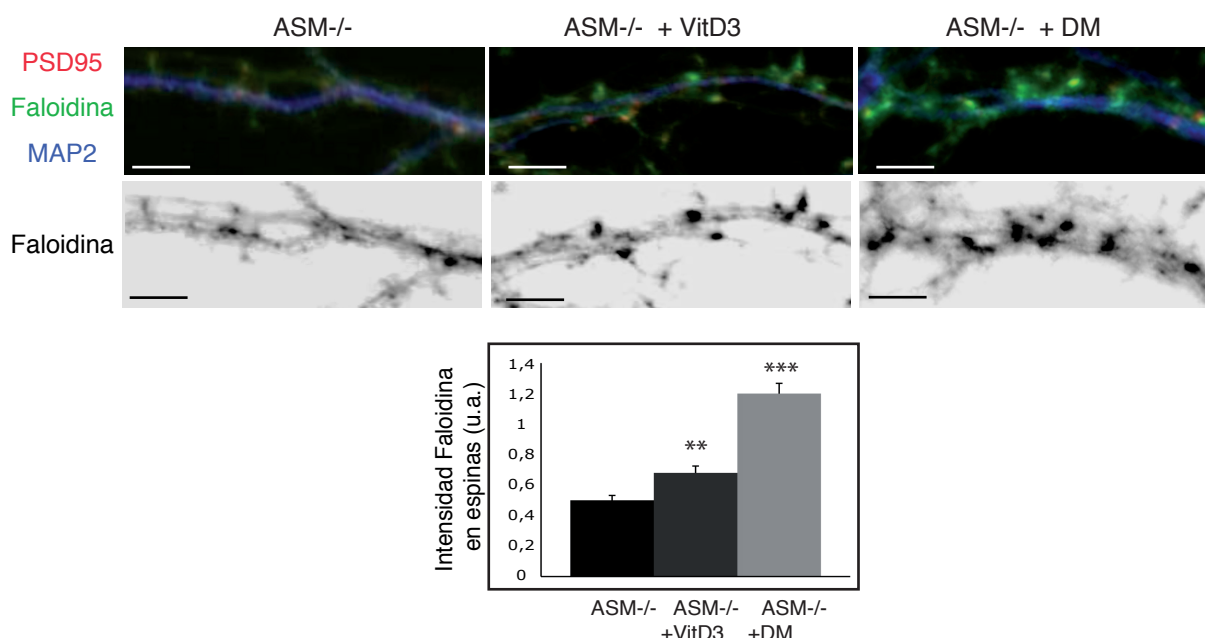
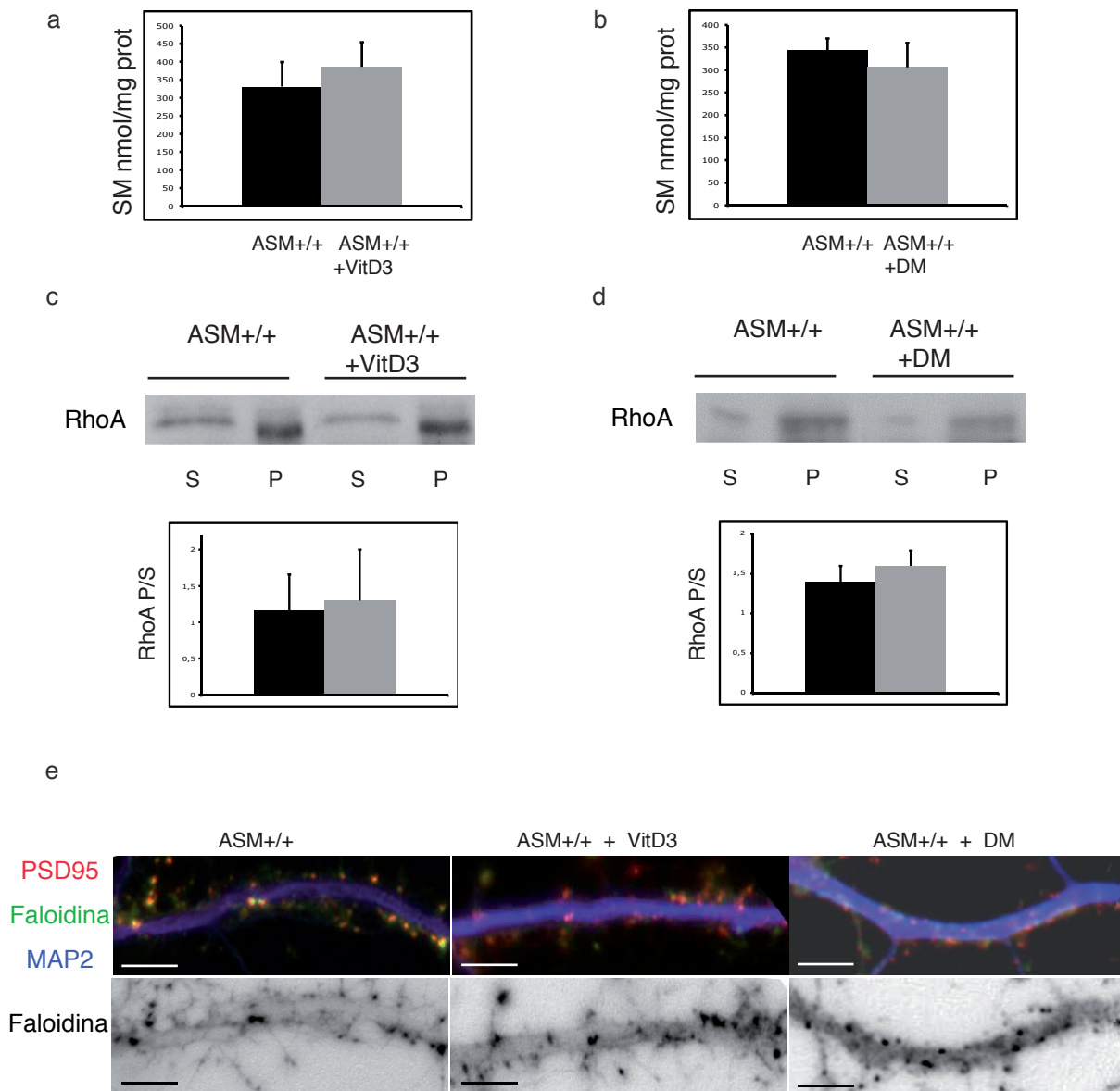


Figura R5E: Los tratamientos con VitD₃ y DM aumentan la cantidad de F-actina en espinas dendríticas de neuronas hipocampales en cultivo de ratones ASM-/-. En los paneles superiores se muestran segmentos dendríticos representativos de neuronas ASM-/- tratadas o no con Vit D₃ y DM.

El co-marcaje se realizó con MAP2 (azul), PSD95 (rojo) y Faloidina (verde). Los paneles inferiores muestran sólo la tinción con Faloidina en escala de grises. Barra de escala= 5 μ m. Los gráficos cuantifican la media y desviación estándar para la intensidad de Faloidina medida por área de espina (n=250 espinas de 3 cultivos independientes; P_{VitD_3} = 0,001; P_{DM} = 0,0008).

Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si los tratamientos con VitD₃ y DM tenían el mismo efecto en sinaptosomas y neuronas hipocampales en cultivo de ratones ASM+/+. No observamos cambios significativos en los niveles de SM ni tampoco en la unión a membrana de RhoA en sinaptosomas ASM+/+ tratados mediante el mismo procedimiento. (**Figura R5F.a, b, c, d**). De acuerdo con ello, al tratar neuronas hipocampales derivadas de ratones ASM+/+ con VitD₃ o DM no registramos un incremento significativo en la F-actina en las espinas dendríticas (**Figura R5Fe**).



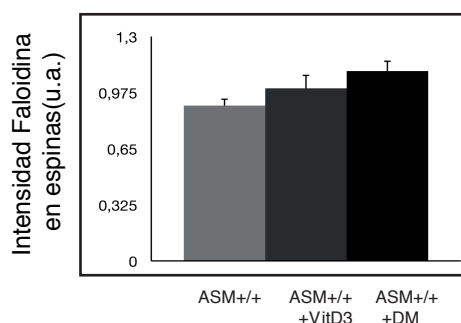


Figura R5F: Los tratamientos con VitD₃ y DM carecen de efectos significativos en sinaptosomas y neuronas hipocámpales en cultivo derivados de ratones ASM+/+. a,b. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar de los niveles de SM (nmol/mg proteína) en sinaptosomas ASM+/+ tratados o no con VitD₃ (a) o DM (b) (n=3). c,d. WB de los niveles de RhoA en la fracción citosólica (S) y de membrana (P) tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas ASM+/+ tratados o no con VitD₃ (c) o DM (d). Las gráficas cuantifican la media y desviación estándar del cociente P/S de RhoA (n=3). e. Segmentos dendríticos representativos de neuronas ASM+/+ tratadas o no con VitD₃ o DM. El marcaje se realizó con MAP2 (azul), PSD95 (rojo) y Faloidina (verde). Los paneles inferiores muestran sólo la tinción de Faloidina en escala de grises. Barra de escala= 5 µm. La gráfica cuantifica la media y la desviación estándar de la intensidad de Faloidina por área de espina dendrítica (n=250 espinas de 3 cultivos independientes).

En conjunto, estos resultados demuestran que la reducción en la cantidad de F-actina en las espinas dendríticas de neuronas ASM-/- se debe al acúmulo de SM en las membranas sinápticas que dificulta la unión a membrana de RhoA y por tanto su activación. También indican que compuestos que activan la NSM como la VitD₃ y la DM son capaces de revertir estos efectos en sinaptosomas y cultivos neuronales de ratones ASM-/- mientras que no afectan a sinaptosomas o cultivos de ratones ASM+/+.

6. La administración oral de DM previene las anomalías en SM y RhoA en sinapsis, incrementa el tamaño de las espinas dendríticas, evita la muerte neuronal y mejora déficits de comportamiento en ratones ASM-/-.

Nuestro siguiente objetivo fue probar la efectividad in vivo de los tratamientos realizados in vitro. Dada la mayor eficiencia de la DM decidimos probar este glucocorticoide sintético. Además, la DM es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Stumpf et al., 1989; Stumpf, 2012) y se utiliza como terapia en diferentes enfermedades humanas (Fritz et al. 2012; De Cassan et al. 2012; Kanwar et al., 2013). Tratamos ratones ASM+/+ y ASM-/- de ambos sexos en grupos de 10 animales cada uno comenzando inmediatamente después del destete cuando tenían un mes de edad. Suministramos la DM disuelta en etanol en el agua de bebida de manera que cada ratón consumiera una concentración aproximada de 0,3 µg DM/g de peso/día. Esta concentración es similar a la que se suministra en tratamientos de larga duración en

pacientes pediátricos. Los ratones pertenecientes al grupo control recibieron etanol en el agua de la bebida a la misma concentración que los tratados con DM (0,1% v/v). Los tratamientos se mantuvieron durante 2,5 meses. Pasado este tiempo los ratones fueron evaluados en tests de comportamiento motor y de memoria tras lo que se realizaron análisis bioquímicos en sinaptosomas y de microscopía electrónica e inmunohistoquímica en tejido cerebral con los resultados que se describen a continuación.

No observamos cambios significativos en la cantidad de SM ni en la unión de RhoA a membrana en sinaptosomas de ratones ASM+/+ tratados con DM (**Figura R6A**).

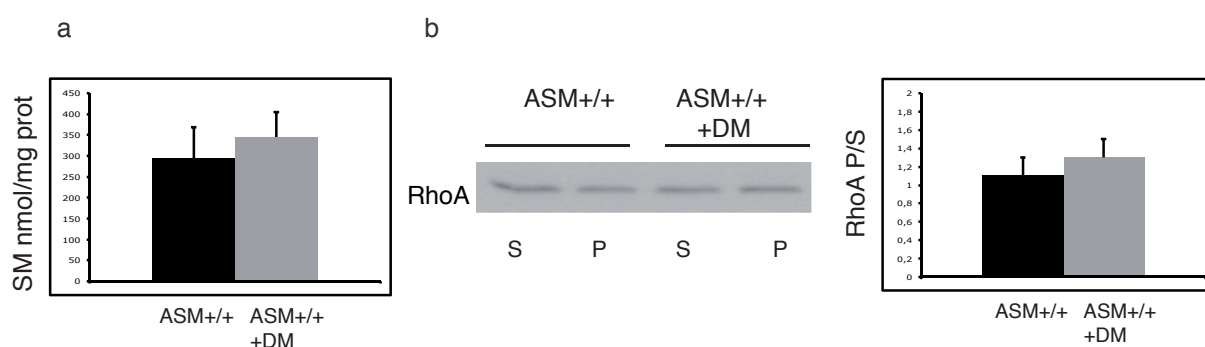
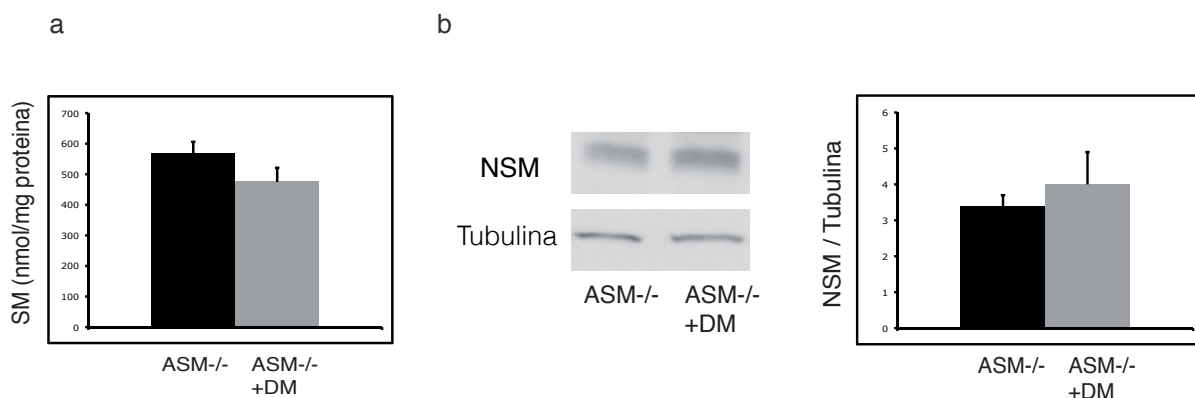


Figura R6A: El tratamiento oral con DM no altera los niveles de SM ni el anclaje de RhoA a la membrana sináptica en ratones ASM+/+. a. La gráfica cuantifica los niveles de SM en nmol/mg de proteína en sinaptosomas derivados de ratones ASM+/+ tratados o no con DM (n=10). b. WB de los niveles de RhoA en citosol (S) y membrana (P) tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas derivados de ratones ASM+/+ tratados o no con DM. La gráfica cuantifica la media y la desviación estándar del cociente P/S de RhoA (n=10).

Por otro lado, la mitad de los machos ASM-/- tratados con DM presentaron una disminución de los niveles de SM en sus sinaptosomas, sin embargo esta reducción (16% respecto a machos ASM-/- no tratados) no llegó a ser significativa. Asimismo, los cambios en los niveles proteicos de NSM2 y en el anclaje de RhoA a la membrana no fueron significativos en los sinaptosomas de machos ASM-/- tratados con DM aunque si encontramos una tendencia al incremento (1,2 y 1,6 veces mayores, respectivamente) (**Figura R6B.a, b, c**).



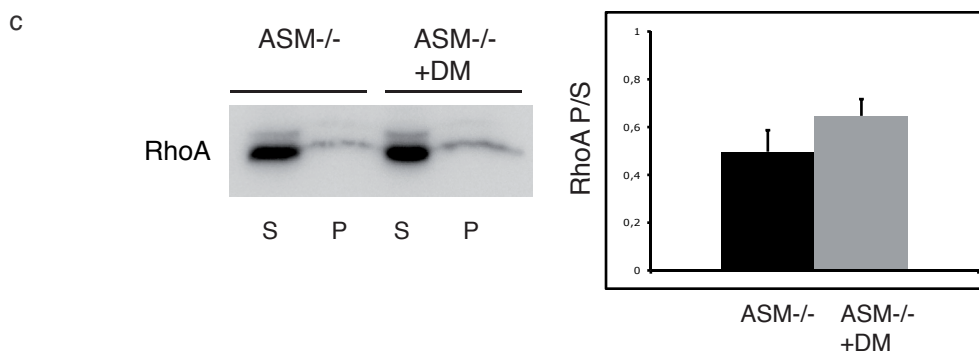
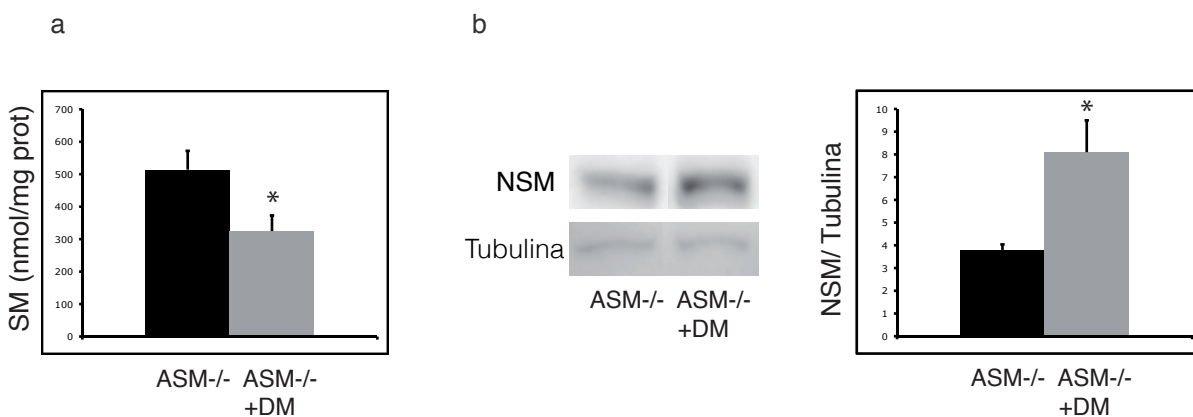


Figura R6B: El tratamiento oral con DM en los machos ASM-/- no altera de manera significativa los niveles de SM, la expresión de NSM ni el anclaje de RhoA a la membrana sináptica. a. La gráfica cuantifica los niveles de SM (nmol/mg proteína) en sinaptosomas derivados de machos ASM-/- tratados o no con DM (n=10). **b.** WB de los niveles de NSM y tubulina en sinaptosomas de machos ASM-/- tratados o no con DM. La gráfica cuantifica la media y la desviación estándar de los niveles de NSM normalizados con respecto a tubulina (n=10). **c.** WB de los niveles de RhoA en la fracción citosólica (S) y de membrana (P) tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas derivados de machos ASM-/- tratados o no con DM. La gráfica representa la media y desviación estándar del cociente P/S de RhoA (n=10).

Cuando analizamos el grupo de hembras ASM-/- tratadas con DM si observamos cambios significativos. La cuantificación de los niveles de SM en los sinaptosomas reveló una reducción de los niveles de este lípido de un 36,7% con respecto a las hembras ASM-/- control (**Figura R6Ca**). Confirmamos que esto venía acompañado de un incremento de los niveles sinápticos de la proteína NSM2 (113%) (**Figura R6Cb**). Esto correlacionaba además con un aumento transcripcional de la enzima ya que mediante PCR cuantitativa detectamos 2 veces más mRNA de la NSM2 en los extractos de cerebro de las hembras ASM-/- tratadas con respecto a las no tratadas (**Figura R6Cc**). La unión a la membrana sináptica de RhoA también se incrementó significativamente (1,7 veces) tras los tratamientos con DM (**Figura R6Cd**).



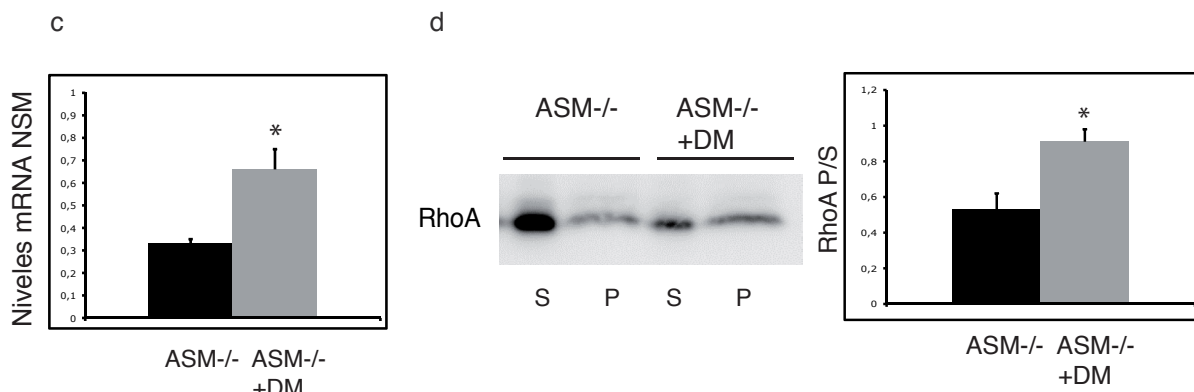


Figura R6C: El tratamiento oral con DM disminuye los niveles de SM, aumenta los niveles proteicos y de mRNA de NSM y la unión de RhoA a la membrana sináptica en hembras ASM-/-. **a.** La gráfica cuantifica la media y desviación estándar de los niveles de SM (nmol/mg proteína) en sinaptosomas de hembras ASM-/- tratadas o no con DM ($n=10$; $P_{SM}=0,03$). **b.** WB de los niveles de NSM y tubulina en sinaptosomas. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar de los niveles de NSM normalizados con respecto a tubulina ($n=10$; $P_{NSM}=0,024$). **c.** La gráfica cuantifica los niveles del mRNA de NSM en extractos de cerebros de hembras ASM-/- tratadas o no con DM ($n=10$; $P_{mRNA}=0,03$). **d.** WB de los niveles de RhoA en la fracción citosólica (S) y de membrana (P) tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas de hembras ASM-/- tratadas o no con DM. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar del cociente P/S de RhoA ($n=10$; $P=0,01$).

Para determinar si las observaciones bioquímicas hechas en sinaptosomas derivados de las hembras ASM -/- tratadas con DM se reflejaban en cambios en el tamaño de las espinas dendríticas, analizamos el tejido cerebral por microscopía electrónica. Este análisis reveló un incremento del 36% en la longitud de la PSD de las sinapsis procedentes del CA1 hipocámpal en las hembras ASM-/- tratadas con DM respecto a las no tratadas (**Figura R6D**).

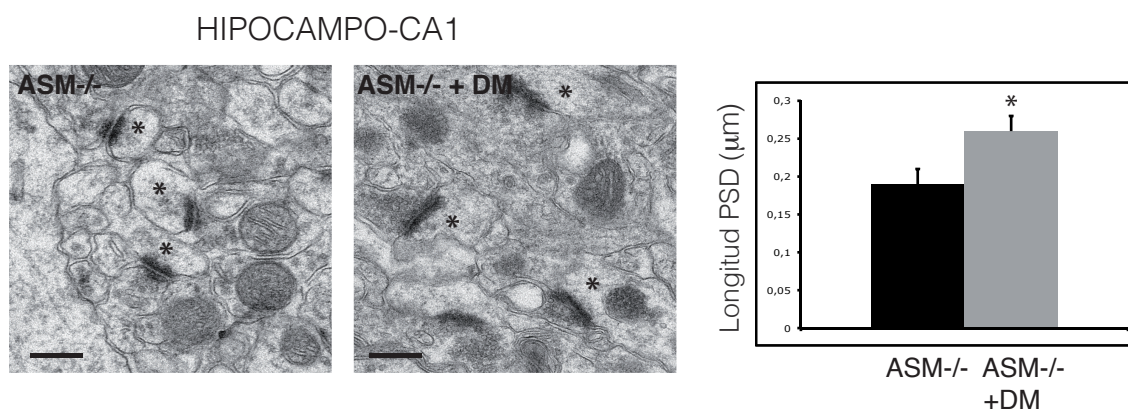


Figura R6D: El tratamiento oral con Dexametasona incrementa el tamaño de las espinas dendríticas en el hipocampo de hembras ASM-/-. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica representativas de sinapsis del stratum radiatum del CA1 hipocámpal en hembras ASM-/- tratadas o no con DM. Las espinas dendríticas se indican mediante asteriscos. Barra de escala: 200 nm. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar de la longitud de la PSD en μm ($n=70$ sinapsis en cada ratón de los 3 analizados por condición; $P=0,031$).

Dados los efectos beneficiosos del tratamiento oral con DM en la cantidad de SM, la activación de NSM, la unión a membrana sináptica de RhoA y el tamaño de las espinas dendríticas en hembras ASM-/-, decidimos comprobar si el tratamiento también evitaba la neurodegeneración. Ésta se produce fundamentalmente en las células de Purkinje del cerebelo que sufren una muerte temprana en el ratón ASM-/- llegando a desaparecer casi por completo en estadios avanzados de la enfermedad (Macauley et al., 2008). Empleamos cortes de cerebelo procedentes de hembras ASM-/- tratadas o no con DM que fueron teñidos con anti-Calbindina-1, un marcador específico para las células de Purkinje. La inmunohistoquímica reveló que el tratamiento con DM previene la pérdida de este tipo de neuronas, encontrando un incremento significativo de un 59% más células de Purkinje por unidad de área en hembras ASM-/- tratadas con DM con respecto a las no tratadas (**Figura R6E**).

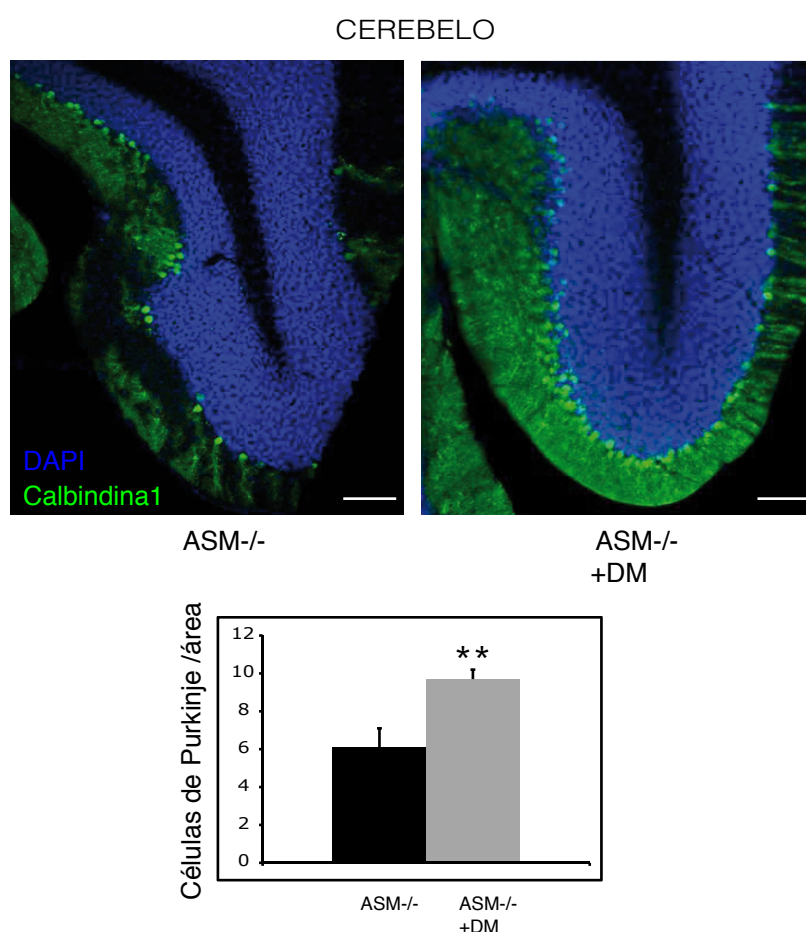


Figura R6E: El tratamiento oral con DM previene la degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo de las hembras ASM-/-. Imágenes obtenidas por microscopía confocal en cortes de cerebelo de hembras ASM-/- tratadas o no con DM. Las células de Purkinje se identificaron mediante el marcaje específico con un anticuerpo contra Calbindina-1(verde). Se muestra también el co-marcaje de los núcleos celulares con DAPI (azul). Barra de escala= 100 μ m. La gráfica cuantifica la media y desviación estándar del número de células de Purkinje por unidad de área (n=3; P= 0,006).

Finalmente quisimos comprobar si los efectos beneficiosos del tratamiento oral con DM observados en el hipocampo y el cerebelo de hembras ASM-/- provocaban una mejora funcional. Para ello realizamos tests de comportamiento indicativos de las capacidades de memoria y motoras, controladas por hipocampo y cerebelo, respectivamente, en los grupos de hembras ASM+/+ y de hembras ASM-/- tratadas o no con DM.

El hipocampo coordina la memoria espacial. Por ello elegimos el test de comportamiento Y MAZE (Cognato et al., 2010), que da una medida de la memoria espacial de los ratones ya que se basa en la capacidad discriminativa frente a espacios nuevos o previamente explorados. El tiempo invertido en el espacio nuevo fue 2,7 veces menor en el caso de las hembras ASM-/- en comparación con las ASM+/+ (ASM+/+: 104 ± 10 s; ASM-/=: 38 ± 5 s) confirmando los déficits en memoria espacial de las hembras ASM-/- sin tratar. Tras el tratamiento con DM la memoria espacial de las hembras ASM-/- aumentaba incrementando en 1,8 veces el tiempo de exploración en el espacio nuevo respecto a las hembras ASM-/- no tratadas y acercándose de manera significativa a los tiempos empleados por las hembras ASM+/+ (**Figura R6F**).

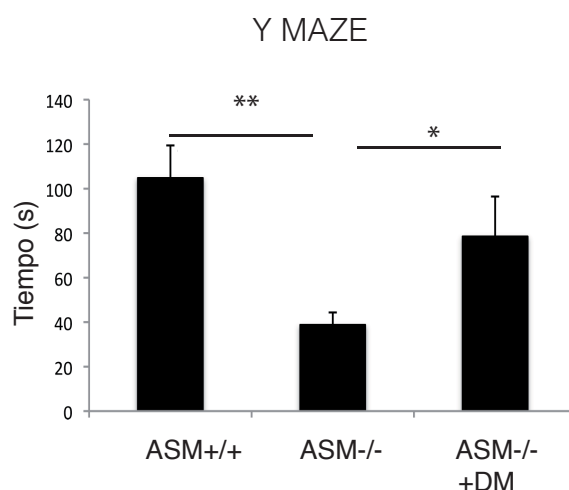


Figura R6F: El tratamiento oral con DM mejora la memoria espacial en hembras ASM-/-. La gráfica cuantifica los resultados del test de comportamiento Y MAZE en hembras ASM+/+, ASM-/- y ASM-/- tratadas con DM como la media y la desviación estándar del tiempo en segundos que los ratones invierten en la exploración del brazo nuevo (n=7; $P_{ASM-/- \text{ VS } ASM+/+} = 0,009$; $P_{DM \text{ ASM-/- VS ASM-/-}} = 0,021$).

Por último investigamos el efecto del tratamiento oral con DM en la coordinación motora que controla el cerebelo mediante el test del Polo vertical (Ogawa et al., 1985). Este test mide el tiempo que invierten los ratones en reorientarse y descender por un eje vertical tras un entrenamiento previo. Mientras que el 100% de las hembras ASM+/+ completaron el test en menos de 50 segundos, ninguna de las ASM-/- sin tratar lo hizo, confirmando el déficit motor en éstas últimas.

Tras el tratamiento con DM el 63% de las hembras ASM-/- completó el test en menos de 50 segundos (**Figura R6G**).

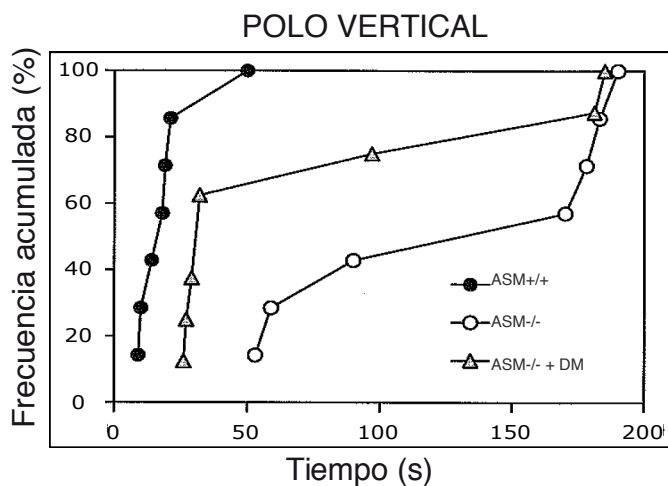


Figura R6G: El tratamiento oral con DM mejora la coordinación motora en hembras ASM-/-. La gráfica cuantifica los resultados del test del Polo vertical en hembras ASM+/+, ASM-/- y ASM-/- tratadas con DM como la frecuencia acumulada del tiempo total en segundos que los animales emplean en descender del polo. El análisis estadístico con la prueba chi-cuadrado confirmó la diferencia entre hembras ASM+/+ y ASM-/- ($P=0,0009$) así como entre las hembras ASM-/- tratadas o no con DM ($P=0,037$), $n=7$.

En conjunto, estos resultados demuestran la eficacia del tratamiento oral con DM en hembras ASM-/- que disminuye los niveles de SM mediante el aumento de la cantidad de NSM lo que favorece la unión a membrana de RhoA en sinaptosomas. Además, el tratamiento con DM previene la disminución del tamaño de las espinas dendríticas en el hipocampo y evita la degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo. Estos efectos se reflejan en la mejora de la memoria espacial y de la coordinación motora de las hembras ASM-/- tratadas.

DISCUSIÓN

Los resultados experimentales presentados en esta tesis doctoral contribuyen a comprender mejor un campo hasta ahora muy poco explorado: el papel de los lípidos en la sinapsis. Por otro lado, aportan información sobre la patología y sobre posibles estrategias terapéuticas para una enfermedad, NPA, que provoca retardo mental y muerte en la infancia y que actualmente no tiene ningún tratamiento. Consideramos que, utilizando como sistema experimental ratones ASM-/- que mimetizan la NPA, este trabajo hace tres aportaciones principales:

- La descripción del fenotipo alterado en espinas dendríticas
- La caracterización del mecanismo molecular subyacente a dicho fenotipo.
- El ensayo de estrategias farmacológicas que previenen las alteraciones detectadas *in vitro* e *in vivo*.

1. INFLUENCIA DE LA SM EN EL CITOESQUELETO DE ACTINA DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS.

El gran dinamismo de las espinas dendríticas, que cambian su tamaño y forma en respuesta a estímulo, es un factor clave en la plasticidad sináptica y por tanto en los procesos de aprendizaje y memoria. La remodelación de la membrana postsináptica y del citoesqueleto de actina, enriquecido en las espinas, dirigen este dinamismo. A pesar de ello se conoce muy poco sobre cómo los cambios en la membrana se coordinan con los del citoesqueleto. Nuestros resultados aportan información sobre los mecanismos moleculares que regulan esta coordinación. Así, han revelado una vía de señalización que relaciona los niveles de un lípido especialmente enriquecido en las membranas sinápticas, la SM, con la polimerización de la actina en espinas. En esta vía participan enzimas catabólicas de la SM (ASM y NSM), receptores de neurotransmisores (mGluR1/5) y proteínas moduladoras de actina (la GTPasa RhoA y sus proteínas efectoras ROCKII y PIIa). De acuerdo con un papel relevante de esta vía en el control del tamaño de las espinas dendríticas, observamos que la ausencia de ASM, que conduce a un aumento de la SM en la membrana y a una deficiente activación de RhoA y sus efectores, da lugar a espinas más pequeñas. Aunque esta alteración afecta a todas las áreas del cerebro estudiadas, lo hace en distinto grado. Así, mientras que en neuronas del hipocampo y el cerebelo la ausencia de ASM provoca una disminución similar del tamaño de las espinas sin afectar a su número, en neuronas del córtex la reducción del tamaño de las espinas es mayor llevando incluso a su desaparición. Las diferencias entre las distintas poblaciones neuronales podrían explicarse por la distinta sensibilidad a los cambios en los niveles de SM que a su vez podría responder a distintos niveles basales del lípido o a la existencia de mecanismos compensatorios más o menos robustos frente a la elevación de sus niveles. Este es un campo que requiere de más investigación y que podría tratar de entender también por qué las células de Purkinje del cerebelo son particularmente susceptibles a la ausencia de ASM siendo las que degeneran más rápido en los

ratones ASM-/- y en pacientes de NPA (Horinouchi et al., 1995; Otterbach & Stoffel, 1995). Podemos especular que el fenotipo molecular de estas neuronas las haría especialmente vulnerables al aumento de SM y sus consecuencias. Así, presentan actividad específica de la Calbindina que interviene en la LTD dependiente de mGluR 1/5 (Barski et al., 2003) y una elevada expresión de p75 que depende de los niveles de SLs (Brann et al., 1999).

2. CAUSAS DE LA DEFICIENTE ACTIVACIÓN DE RhoA EN ESPINAS DENDRÍTICAS CARENTES DE ASM.

Como hemos mencionado anteriormente la unión a la membrana de las Rho GTPasas es necesaria para su activación (Leung et al., 1995; Matsui et al., 1996; Schubert et al., 2006). En esta tesis hemos demostrado que la acumulación de SM es responsable de la menor asociación de RhoA a la membrana sináptica, y por tanto de la menor activación de la vía de señalización de esta GTPasa en espinas dendríticas. Una deficiente unión de RhoA a la membrana podría explicarse por alteraciones en las modificaciones postraduccionales requeridas para su interacción con lípidos. En concreto, RhoA ha de estar prenilada, lo que supone la adición de un grupo geranil-geranil a su molécula (Newman & Magee, 1993; Allal et al., 2000; Adamson et al., 1992; Hori et al., 1991; Solski et al., 2002). La producción de grupos geranil-geranil depende a su vez de la activación de la vía del mevalonato que influye en la de la síntesis de colesterol (Jo et al., 2010). La alteración en los niveles basales de SM y sus metabolitos, con gran afinidad por el colesterol, podría afectar a la distribución y/o niveles de este último modulando la vía del mevalonato (Gupta & Rudney, 1991). De hecho, se sabe que entre otros efectos, la SM y sus metabolitos activan la enzima clave en la síntesis de colesterol, la HMG-CoA (3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA) reductasa. Dada la alteración observada en los niveles de SM se podría postular que la deficiente unión de RhoA a membranas carentes de ASM podría deberse a una pobre producción de grupos geranil-geranil que conduciría a una menor prenilación de la GTPasa.

Alternativamente, alteraciones topológicas de la membrana sináptica debidas a la acumulación de la SM, podrían dificultar la unión de RhoA. Aunque la SM se encuentra mayoritariamente en la cara externa de la membrana (Tyteca et al., 2010) y las Rho GTPasa se unen por la cara citoplasmática, el aumento patológico del lípido podría estar alterando igualmente la topología de esta región de la membrana.

En cualquier caso, las deficiencias en la prenilación o las alteraciones topológicas deberían afectar de igual manera la asociación a la membrana de RhoA y de otras GTPasas de la misma familia como Cdc42 y Rac1 que presentan los mismos requerimientos. Sin embargo, los resultados obtenidos en sinaptosomas carentes de ASM-/- demuestran que estas proteínas no están afectadas. Así mismo, estudios realizados en fibroblastos indicaron que la disminución de los niveles de esfingolípidos reduce la unión a membrana tanto de RhoA como de Cdc42 (Cheng et al., 2006).

Nuestros resultados sugieren que aunque el aumento de los niveles del principal esfingolípido, la SM, tiene el mismo efecto que su disminución sobre la unión a membrana de RhoA, el mecanismo subyacente es distinto y se basa en la especificidad de la interacción de RhoA con los mGluR1/5 (Schubert et al., 2006). Demostramos que la acumulación de SM disminuye los niveles sinápticos de estos receptores y su interacción con RhoA. Aunque son necesarias futuras investigaciones para determinar por qué el aumento de SM reduce los niveles de mGluR1/5 en la membrana sináptica, postulamos que esto puede ser debido a la composición alterada de los rafts lipídicos en ausencia de ASM (Galvan et al., 2008). Se ha demostrado que la incorporación de los mGluR1/5 a estos dominios de membrana regula su internalización y por tanto su expresión en la superficie neuronal (Francesconi et al., 2009). La alteración de estos dominios por aumento de SM modificaría la asociación de los mGluR1/5 afectando a su estabilidad y/o internalización. Resultados preliminares obtenidos al comparar la distribución de RhoA en estos dominios en membranas sinápticas de ratones ASM+/+ o ASM-/- indican una menor asociación de RhoA a estos últimos (**Figura D1**) lo que apoyaría nuestra hipótesis. Además, se ha descrito que la unión a membrana y acoplamiento a efectores en respuesta a estímulo de las RhoGTPasa se favorece en rafts lipídicos (del Pozo et al., 2004; Palazzo et al., 2004). Esta observación contribuiría a explicar la deficiente activación de la vía de RhoA en sinaptosomas carentes de ASM.

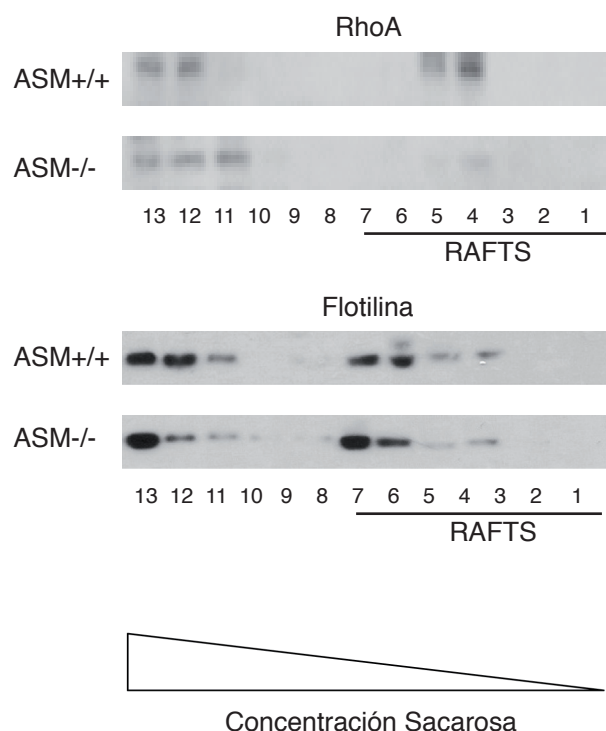


Figura D1: Menor presencia de RhoA en rafts lipídicos en sinaptosomas de ratones ASM-/-. WB de la distribución de RhoA y la proteína marcadora de rafts Flotilina en las fracciones de membrana de sinaptosomas ASM+/+ y ASM-/- obtenidas tras extracción en frío con TritonX-114 y gradiente de sacarosa. Las fracciones ligeras (de 1 a 7) corresponden a los rafts. La distribución de flotilina muestra el correcto aislamiento de los rafts en condiciones ASM+/+ y ASM-/-.

3. CONSECUENCIAS DE LA CARENCIA DE ASM EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RhoA EN ESPINAS DENDRÍTICAS.

El citoesqueleto de actina de las espinas dendríticas es particularmente dinámico requiriendo una fina regulación tanto temporal como espacial. Por ello, son muchas las proteínas reguladoras de actina presentes en estas estructuras. La actividad de proteínas nucleadoras de actina, como N-WASP o Arp2/3, junto con la de la familia de las RhoGTPasas es un elemento clave. Estas últimas no ejercen su función interactuando directamente con la actina si no gracias a efectores que en última instancia se unen a monómeros y/o filamentos de actina para estabilizarlos o desestabilizarlos. Se han caracterizado diversos efectores gracias a los cuales RhoA ejerce su influencia en la actina en distintas situaciones y tipos celulares. Entre ellos están ROCKII y PIIa. Se ha descrito que la acción conjunta de estos efectores tras la activación de RhoA juega un importante papel en la regulación de la F-actina en las espinas dendríticas (Da Silva et al., 2003; Schubert et al., 2006).

De acuerdo con esto nuestros resultados indican que los niveles de SM en la membrana postsináptica modulan la cantidad de F-actina en espinas a través de la activación de la cascada RhoA-ROCK-PIIa. Sin embargo, estos datos no descartan que otros moduladores de actina también estén implicados en los efectos. Así, la activación de ROCKII podría señalar también mediante la LIM quinasa (LIMK), que a su vez fosforila e inhibe la función del complejo ADF/cofilina, evitando su acción despolimerizante y por tanto estabilizando la red de filamentos de actina (Maekawa et al., 1998; Riento & Ridley, 2003). Aunque no hemos explorado esta posibilidad, cabría esperar, que la menor activación de ROCKII observada en ausencia de ASM inhibiese LIMK lo que permitiría al complejo ADF/cofilina despolimerizar la F-actina lo que contribuiría a explicar el menor contenido en espinas ASM-/-.

Por otro lado, PIIa tiene una función estabilizadora de la F-actina disminuyendo los niveles de monómeros libres de actina a quienes secuestra, por ser más afín a la actina ligada a ATP. Este es un proceso en el que participan también otros miembros del citoesqueleto asociados a membrana como la proteína ENA/VASP con los que PIIa forma un complejo. Este complejo es capaz de polimerizar actina en forma de filamentos largos no ramificados (a partir de extremos (+) preexistentes) en presencia de proteínas “capping” y por medio de la proteína SAS (Barzik et al., 2005). En neuronas se ha descrito que el efector directo de RhoA, ROCK II es capaz de interactuar directamente con PIIa y activarla mediante su actividad serin-treonin kinasa (Da Silva et al., 2003).

Todas estas posibilidades son la base para seguir explorando en el futuro otros efectores de la vía de RhoA/ROCKII/PIIa implicados en la disminución de F-actina en ausencia de ASM.

4. RELEVANCIA SINÁPTICA DE LA ASM, UNA ENZIMA PRINCIPALMENTE LISOSOMAL.

Durante mucho tiempo se consideró que la ASM era una enzima exclusivamente lisosomal con una presencia mayoritaria en estos organelos y, en consecuencia, con un pH ácido como requisito para una actividad óptima (Stoffel, 1999). Más recientemente se describió un pequeño reservorio de la ASM en la membrana plasmática (Grassme et al., 2001) y que la enzima puede translocarse a la cara exoplásmica de la membrana plasmática en respuesta a diferentes estímulos estresantes (Smith & Schuchman, 2008; Gulbins et al., 2003). De acuerdo con estas observaciones diversos estudios comprobaron que la ausencia de ASM provocaba un aumento de los niveles de SM no sólo en los lisosomas si no también en la membrana plasmática (Galván et al., 2008) y sináptica (Camoletto et al., 2009). Los resultados de esta tesis confirman que la acumulación de SM por falta de ASM también se extiende a la membrana post sináptica afectando de manera significativa al tamaño de las espinas dendríticas. La pregunta surge sobre cómo una enzima ácida puede funcionar en la membrana sináptica cuyo pH es neutro. Varias alternativas podrían responder a esta pregunta. Por un lado, se ha descrito que procesos de membrana como la endocitosis pueden provocar bajadas locales de pH en la superficie celular (Bourguignon et al., 2004; Steinert et al., 2008). Por otro lado, ASM es capaz de degradar SM dentro de partículas LDL (low density lipoproteins) a pH neutro (Schissel et al., 1998). Además, se ha descrito que tras la exposición a radiación ultravioleta la proteína quinasa C δ (PKC δ) fosforila a la ASM dirigiéndola a la membrana y favoreciendo su funcionamiento a pH fisiológico (Zeidan & Hannun, 2007; Zeidan et al., 2008). Todos estos datos apoyan la capacidad de la ASM de funcionar en la membrana plasmática a pH neutro aunque con una menor eficiencia que en el lisosoma.

Es importante destacar que en el cerebro una actividad basal mínima de la ASM es suficiente para evitar anomalías. Así, pacientes con la enfermedad de Niemann Pick tipo B, cuyas mutaciones en el gen que codifica para la ASM rebajan la actividad de la enzima hasta a un 5% de la normal, no tienen implicaciones neurológicas. Sólo cuando esa actividad está por debajo del 1-2% se desarrolla la NPA caracterizada por una afectación neurológica muy rápida y severa (Schuchman, 2007, 2009). Estos datos indican un papel esencial de la ASM en el funcionamiento neuronal pero sugieren, así mismo, que una baja actividad de la enzima podría ser suficiente para cumplir su papel en la membrana sináptica. Esto abre la esperanza de que estrategias orientadas a aumentar la actividad residual de la ASM aún con baja eficiencia puedan tener éxito como terapia para la NPA.

5. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE LA NSM2 EN LAS SINAPSIS CARENTES DE ASM.

Los estudios de esta tesis doctoral muestran que una alternativa a una terapia centrada en la modulación de la ASM es la activación de la enzima de función análoga NSM2. Demostramos que tratamientos con la VitD₃ o con el glucocorticoide sintético DM, que son capaces de aumentar los niveles y actividad de NSM, reducen la cantidad de SM y revierten los fenotipos moleculares aberrantes *in vitro*. Aunque con baja eficiencia, ambos compuestos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Pardridge et al., 1985; Stumpf et al., 1989; Stumpf, 2012) y se han utilizado previamente en el tratamiento crónico de enfermedades humanas, algunas de ellas pediátricas (Bonthius & Karakay, 2002; Holick, 2005; Cole, 2006). Esto da relevancia a los resultados obtenidos con el tratamiento oral con DM en ratones ASM^{-/-} de cara a un posible tratamiento en pacientes de NPA. Nuestros resultados *in vivo* muestran el efecto de la DM en las hembras ASM^{-/-} tratadas, reduciendo la acumulación de SM en sinapsis y aumentando los niveles proteicos de NSM, lo que previene las anomalías en espinas observadas a nivel morfológico y molecular. Hemos observado también la capacidad del tratamiento para evitar la muerte neuronal en cerebelo así como para mejorar la funcionalidad motora y de memoria. Es interesante destacar la mayor eficiencia del tratamiento en las hembras. Así, aunque la tendencia en los parámetros analizados era similar en los machos los resultados no fueron significativos. Esto podría deberse a la menor activación de NSM observada en la sinapsis de los ratones machos ASM^{-/-} lo que provocaría una menor degradación del exceso de SM (**Figuras R6Bb y R6Cb**). Las razones de estas diferencias están por determinar.

En cualquier caso, además de los efectos evidenciados en los niveles de SM de la sinapsis y su influencia en el citoesqueleto de actina, la activación de la NSM2 podría afectar directamente a la excitabilidad neuronal. La liberación presináptica de neurotransmisores y la recepción de esa señal en la postsinapsis por sus receptores son fenómenos que dependen de la membrana y de su composición lipídica. Se ha descrito que la NSM es necesaria para la liberación de neurotransmisores promoviendo la fusión vesicular (Jeon et al., 2005). Además, la hidrólisis de la SM mediada por NSM2 regula la excitabilidad en hipocampo mediante la producción de esfingosina-1-fosfato (S1P) que genera una hiperpolarización dependiente de Ca²⁺ (Norman et al., 2010). Por otro lado, cambios en los niveles de SL en la membrana plasmática alteran la inserción de receptores AMPA (Hering et al., 2003), mientras que la inserción de receptores NMDA en respuesta a TNF α requiere la activación de la NSM2 (Wheeler et al., 2009). Aunque en esta tesis no hemos realizado análisis de electrofisiología para determinar alteraciones de la función sináptica en ratones ASM^{-/-}, la reducción observada en los niveles de mGluR1/5 y su menor asociación a RhoA y su cascada de señalización a actina en respuesta estímulo, sugieren deficiencias en la excitabilidad sináptica. La activación de NSM2 podría contribuir a prevenir o corregir estos defectos en el contexto patológico.

6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA DM.

Aunque la DM es un fármaco ya utilizado en clínica, los tratamientos prolongados con este glucocorticoide sintético provocan serios efectos secundarios incluyendo retraso en el crecimiento y problemas de comportamiento (Bloom et al., 2001; Wróbel et al., 2014; Cheng et al., 2014). Además, la dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica hace necesaria su administración sistémica en dosis altas para impactar al órgano más afectado en NPA, el cerebro. Esto reduce las expectativas de trasladar las observaciones hechas en los ratones ASM-/- a pacientes de NPA. Conocer en detalle el mecanismo de acción de la DM podría ayudar a mejorar estos tratamientos (reduciendo las dosis o los tiempos) o a identificar terapias alternativas. Nuestros resultados demuestran que la DM reduce los niveles de SM a través de aumentar la actividad de la NSM2. Esto se debe al aumento de los niveles de expresión de la proteína que a su vez viene provocado por el aumento de la transcripción de su mRNA en los cerebros de las hembras ASM-/- tratadas oralmente. Niveles aumentados de mRNA también se observaron en los tratamientos realizados *in vitro* en sinaptosomas, por lo que la DM podría estar induciendo un fenómeno de transcripción local en la postsinapsis. Esto abre interesantes perspectivas sobre la posible regulación de enzimas metabólicas de lípidos en la sinapsis que, al igual que ocurre con proteínas relacionadas con actina, podrían sintetizarse localmente contribuyendo a la rápida remodelación de las espinas en respuesta a estímulo.

Un posible mecanismo de acción de la DM implicaría a los receptores de los glucocorticoides (GCRc), para los que el compuesto es un potente agonista (Jafari et al., 2012). Las diferencias de expresión de este tipo de receptores entre sexos podría explicar las variaciones observadas en la eficiencia de los tratamientos con DM entre machos y hembras ASM-/- (Guenzel et al., 2014; Romeo et al., 2004). Estos receptores modulan la transcripción de numerosos genes (Oakley & Cidlowski, 2013; Ratman et al., 2013) y aunque están mayoritariamente presentes en el citosol también pueden asociarse a la membrana (Liposits & Bohn, 1993). Se podría especular que entre sus genes diana estuviera el de la NSM. La reciente descripción de la presencia de GCRc en la sinapsis (Jafari et al., 2012) podría mediar una potencial transcripción local de esta enzima. Niveles basales de GC se requieren para la memoria y el aprendizaje aunque un exceso crónico altera los procesos de plasticidad (Sapolsky, 1999) además de generar un desequilibrio hormonal con efectos sistémicos dando lugar al síndrome de Cushing (Miyachi, 2000). Por ello, tratamientos prolongados con la DM podrían tener efectos negativos en la señalización mediada por los GCRc. Sin embargo, la expresión de estos receptores en sinapsis depende de la activación de los mGluRsl (Jafari et al., 2012) que presentan bajos niveles en las sinapsis ASM-/- (resultados de esta tesis). Esto posibilita que la exposición crónica a DM recupere niveles normales de GCRc en sinapsis ASM-/- evitándose los efectos deleterios de niveles crónicamente elevados.

Futuras investigaciones deben determinar si los GCRc participan en los efectos beneficiosos de la DM en ratones ASM-/- . Si fuera así, podría plantearse la posibilidad de tratar a pacientes NPA con glucocorticoides menos potentes que la DM como la hidrocortisona y que está especialmente indicada en pacientes pediátricos por tener menos efectos secundarios y por la fácil determinación de sus niveles en sangre.

Además de un efecto directo de la DM sobre los GCRc el mecanismo de acción de este glucocorticoide para modular los niveles de SM podría ser indirecto a través de sus propiedades inmunomoduladoras. Aunque la mayor parte de estudios describen los glucocorticoides como inmunosupresores, los efectos sobre los niveles de citoquinas son variables y en ciertos casos podrían actuar como inmunoestimulantes (Wilckens, 1995). Así, cuando se suministra DM antes de la inducción de daño cerebral para evitar la necrosis neuronal se provoca el incremento de los mRNA de citoquinas como TNF α , TNF β y IL-1. Esto promueve la neuroprotección (Brucoleri et al., 1999) induciendo, como en el caso de la citoquina TNF α (Figiel, 2008), la expresión de proteínas antiapoptóticas, interviniendo en la homeostasis de Ca²⁺ y previniendo excitotoxicidad (Cheng et al., 1994). Además TNF α modula las propiedades fusiogénicas de la membrana sináptica y promueve la inserción de receptores NR1 en la membrana, debido a su papel como potente activadora de la NSM2 (Wheeler et al., 2009). Todo ello sugiere que la DM, mediante la elevación de los niveles de citoquinas como la TNF α , podría incrementar la actividad de NSM reduciendo los niveles de SM en la sinapsis, y podría evitar el daño neuronal en ratones ASM-/- .

Por último, no podemos olvidar que la DM es un potente antiinflamatorio y por ello su uso terapéutico está especialmente indicado para combatir procesos inflamatorios. Para explorar la posibilidad de que este efecto contribuyese a los efectos beneficiosos observados en ratones ASM-/- realizamos ensayos con antiinflamatorios no esteroideos (AINE ó NSAID: non-steroidal anti-inflammatory drug) como el ibuprofeno. El tratamiento *in vitro* en sinaptosomas ASM-/- empleando el mismo procedimiento que con la DM, no afectó significativamente los niveles de SM ni la unión de RhoA a la membrana. Ensayamos también tratamientos *in vivo* mediante la administración oral de ibuprofeno a hembras ASM-/- . Aunque el análisis de los resultados reveló una tendencia a la reducción de los niveles de SM en la membrana sináptica así como de la unión a ella de RhoA, los resultados no fueron estadísticamente significativos (**Figura D2.a, b**). Nuevas investigaciones son necesarias para llegar a conclusiones sobre el papel antiinflamatorio de la DM como posible tratamiento en NPA.

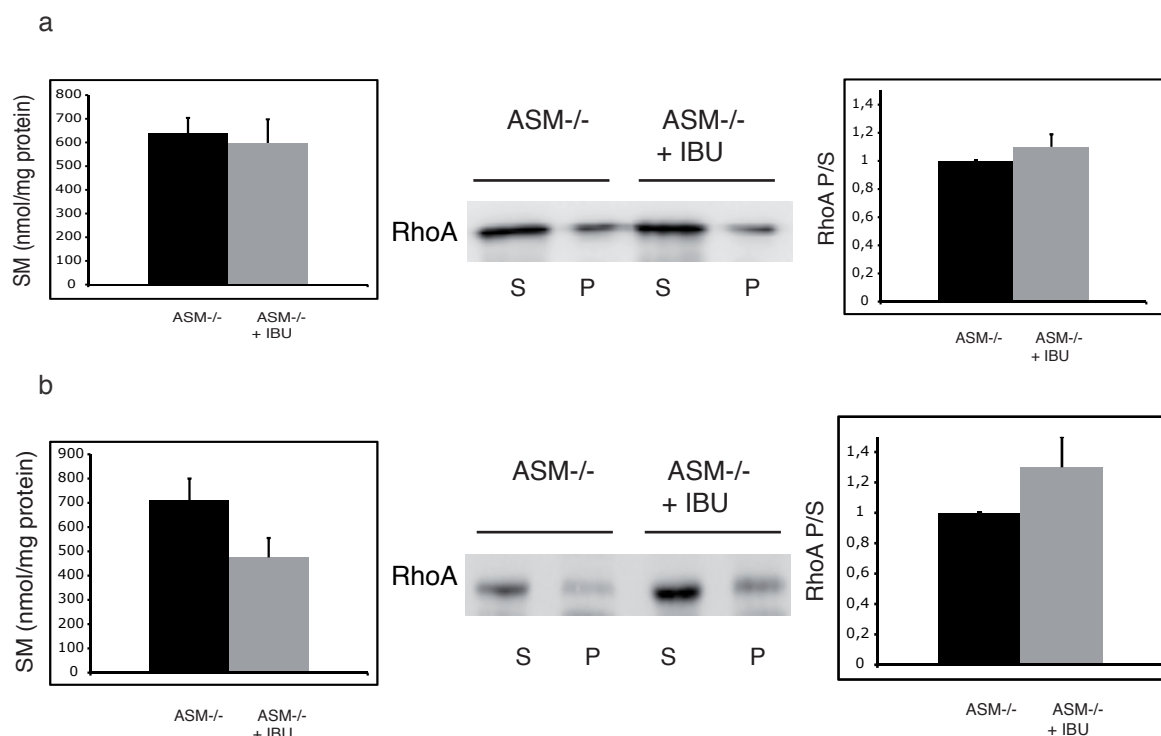


Figura D2: Los tratamientos *in vitro* e *in vivo* con Ibuprofeno no producen efectos significativos en los niveles de SM y unión de RhoA en la membrana sináptica de ratones ASM-/-. a,b. Las gráficas a la izquierda cuantifican los niveles de SM (nmol/mg proteína) en sinaptosomas de ratones ASM-/- tratados con Ibuprofeno *in vitro* (a, n=3) o derivados de ratones ASM-/- tratados oralmente por 2.5 meses a una concentración de 1mg/ml (b, n=10). Los paneles centrales muestran el WB de los niveles de RhoA en la fracción citosólica (S) o de membrana (P) tras la centrifugación a 100.000 g de sinaptosomas procedentes del tratamiento *in vitro* con ibuprofeno (a, n=3) o del tratamiento *in vivo* (b, n=7). Las gráficas a la derecha cuantifican la media y desviación estándar del ratio P/S de RhoA en sinaptosomas tratados referidos a los no tratados, que se consideraron como 1 (a: n=3; b: n=7).

7. PAPEL FISIOLÓGICO Y PATOLÓGICO DE LA SM EN LAS ESPINAS DENDRÍTICAS.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral utilizando ratones ASM-/- nos permiten proponer el siguiente modelo para la función de la SM y sus enzimas catabólicas en espinas dendríticas, las consecuencias de sus alteraciones y la posibilidad de rescate farmacológico.

En condiciones fisiológicas, los niveles de SM en la membrana postsináptica modulan los niveles de mGluR1/5 y a través de ellos la unión a membrana de la GTPasa RhoA y la activación de sus efectores ROCKII y PIIa que controlan a su vez la polimerización de actina en las espinas dendríticas. Este mecanismo contribuye a determinar el tamaño de las espinas dendríticas en situación basal y estimuladora. La carencia de ASM, como ocurre en pacientes de NPA, incrementa la cantidad de SM en la membrana postsináptica disminuyendo los niveles de mGluR 1/5 lo que impide la unión y activación de RhoA y sus efectores ROCKII y PIIa, reduciéndose la cantidad de F-actina y el tamaño de las espinas dendríticas y afectando su respuesta a estímulos.

La reducción de los niveles de SM mediante la activación farmacológica con DM de la NSM2 en la membrana postsináptica, restaura la activación de la vía de RhoA, los niveles de F-actina y el tamaño de espinas dendríticas (**Figura D3**). Los resultados positivos obtenidos con el tratamiento oral con DM en ratones ASM-/- abren nuevas perspectivas para el tratamiento de una enfermedad actualmente incurable como la NPA.

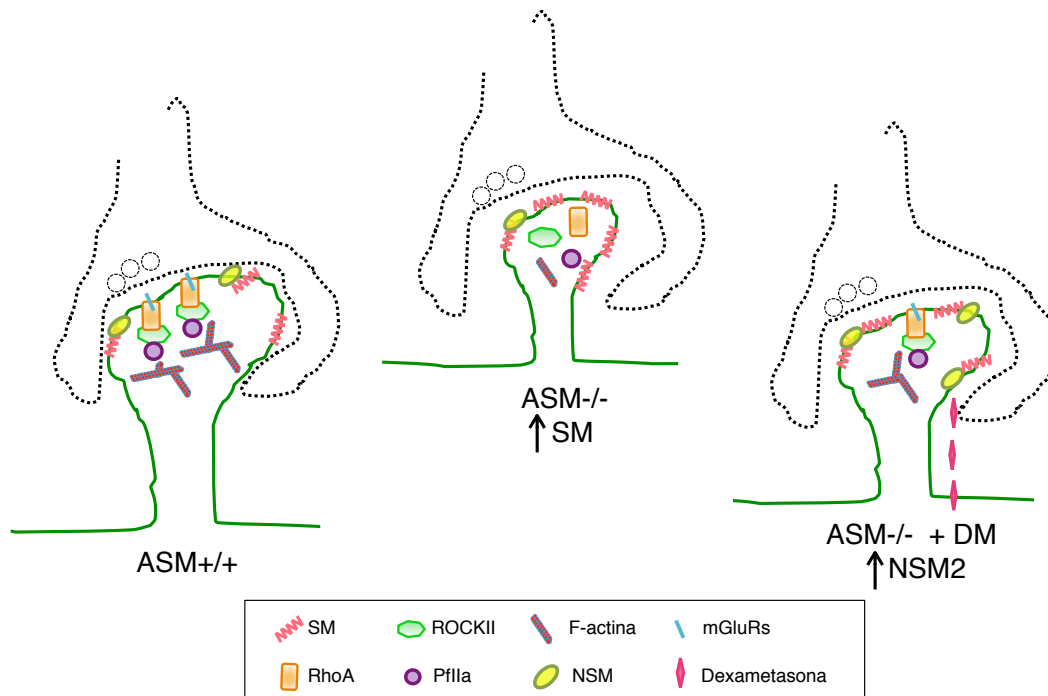


Figura D3: Modelo para la función de la SM y sus enzimas catabólicas en espinas dendríticas. Esquema representativo de las variaciones en el tamaño y los niveles de F-actina en espinas dendríticas, con indicación de las moléculas implicadas en su regulación, en condiciones fisiológicas (ASM+/+) o en ausencia de ASM (ASM-/-) con o sin activación de la NSM2 (ASM-/- + DM).

CONCLUSIONES

-
1. La ausencia de ASM reduce el tamaño de las espinas dendríticas en el hipocampo y el cerebelo de ratones.
 2. Las neuronas carentes de ASM presentan niveles anormalmente altos de SM en la membrana postsináptica.
 3. Las espinas dendríticas de neuronas carentes de ASM presentan bajos niveles de F-actina debido a la acumulación de SM.
 4. La acumulación de SM impide la correcta unión a la membrana sináptica y activación de RhoA y sus proteínas efectoras ROCKII y PIIa.
 5. La acumulación de SM reduce los niveles de mGluR1/5 en la membrana sináptica y su interacción con RhoA.
 6. En ausencia de ASM la activación farmacológica de NSM2 con VitD₃ o DM reduce los niveles de SM y restaura la unión a membrana de RhoA en sinaptosomas y los niveles de F-actina en espinas dendríticas de neuronas en cultivo.
 7. El tratamiento oral con DM previene el aumento de SM en sinapsis y sus consecuencias en la vía de activación de RhoA y en la polimerización de actina en hembras carentes de ASM.
 8. El tratamiento oral con DM evita la reducción del tamaño de las espinas dendríticas, la neurodegeneración, y los déficits de memoria y de coordinación motora en hembras carentes de ASM.

BIBLIOGRAFÍA

Ackermann, M., and Matus, A. (2003). Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat. Neurosci.* 6, 1194-1200.

Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A., and Tilbrook, P.A. (1992). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 20033-20038.

Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell. Biochem.* 49, 241-268.

Alaluf, S., Mulvihill, E.R., and McIlhinney, R.A. (1995). Rapid agonist mediated phosphorylation of the metabotropic glutamate receptor 1 alpha by protein kinase C in permanently transfected BHK cells. *FEBS Lett.* 367, 301-305.

Allal, C., Favre, G., Couderc, B., Salicio, S., Sixou, S., Hamilton, A.D., Sebt, S.M., Lajoie-Mazenc, I., and Pradines, A. (2000). RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 31001-31008.

Allan, D., and Kallen, K.J. (1994). Is plasma membrane lipid composition defined in the exocytic or the endocytic pathway?. *Trends Cell Biol.* 10, 350-353.

Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., and Craig, A.M. (1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptor. *J. Neurosci.* 18, 2423-2436.

Alvarez, V.A., and Sabatini, B.L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 79-97.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.

Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Fukata, Y., Yano, T., Shibata, M., Ikebe, M., and Kaibuchi, K. (1998). Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes Cells* 3, 177-188.

Ango, F., Pin, J.P., Tu, J.C., Xiao, B., Worley, P.F., Bockaert, J., and Fagni, L. (2000). Dendritic and axonal targeting of type 5 metabotropic glutamate receptor is regulated by homer1 proteins and neuronal excitation. *J. Neurosci.* 20, 8710-8716.

Araya, R., Jiang, J., Eisenthal, K.B., and Yuste, R. (2006). The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17961-17966.

Aramori, I., and Nakanishi, S. (1992). Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron*, 8, 757-765.

Arendt, K. L., Royo, M., Fernández-Monreal, M., Knafo, S., Petrok, C.N., and Martens, J.R. (2010). PIP3 controls synaptic function by maintaining AMPA receptor clustering at the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* 13, 36-44.

Aubin, I., Adams, C.P., Opsahl, S., Septier, D., Bishop, C.E., Auge, N., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., Goldberg, M., Guénet, J.L., and Poirier, C. (2005). A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse. *Nat. Genet.* 37, 803-805.

Barenholz, Y., and Thompson, T.E. (1980). Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 604, 129-158.

Barski, J.J., Hartmann, J., Rose, C.R., Hoebeek, F., Mörl, K., Noll-Hussong, M., De Zeeuw, C.I., Konnerth, A., and Meyer, M. (2003). Calbindin in cerebellar Purkinje cells is a critical determinant of the precision of motor coordination. *J. Neurosci.* 23, 3469-3477.

Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 28653-28662.

Bednarek, E., and Caroni, P. (2011). β -Aduccin is required for stable assembly of new synapses and improve memory upon environmental enrichment. *Neuron*, 69, 1132-1146.

Bennett, V., Gardner, K., and Steiner, J.P. (1988). Brain adducin: a protein kinase C substrate that may mediate site-directed assembly at the spectrin-actin junction. *J. Biol. Chem.* 263, 5860-5869.

Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., Saglietti, L., Schuchman, E.H., Furlan, R., Clementi, E., Matteoli, M., and Verderio, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J.* 28, 1043-1054.

Billuart, P., Bienvenu, T., Ronce, N., des Portes, V., Vinet, M.C., Zemni, R., Carrié, A., Beldjord, C., Kahn, A., Moraine, C., and Chelly, J. (1998). Oligophrenin 1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Pathol. Biol.* 46, 678.

- Birbach**, A., Verkuyl, J.M., and Matus, A. (2006). Reversible, activity-dependent targeting of profilin to neuronal nuclei. *Exp. Cell Res.* 312, 2279-2287.
- Bito**, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2000). A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons. *Neuron*, 26, 431-441.
- Blanchoin**, L., Pollard, T.D. and Mullins, R.D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* 10, 1273-1282.
- Blin**, G., Margeat, E., Carvalho, K., Royer, C.A., Roy, C., and Picart, C. (2008). Quantitative analysis of the binding of ezrin to large unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate. *Biophys. J.* 94, 1021-1033.
- Bonhoeffer**, T., and Yuste, R. (2002). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47-67.
- Bonthius** D.J., and Karacay B. (2002) Meningitis and encephalitis in children. An update. *Neurol Clin* 20: 1013 – 1038.
- Bloom**, S.L., Sheffield, J.S., McIntire, D.D., and Leveno, K.J. (2001). Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. *Obstet. Gynecol.* 97, 485-490.
- Bourguignon** L.Y., Singleton, P.A., Diedrich, F., Stern, R., and Gilad, E. (2004). CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 279: 26991 – 27007.
- Bourne**, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47-67.
- Brady**, R.O., Kanfer, J.N., Mock, M.B., and Fredrickson, D.S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55, 366-369.
- Brann**, A.B., Scott, R., Neuberger, Y., Abulafia, D., Boldin, S., Fainzilber, M., and Futerma, A.H. (1999). Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 8199-8206.

Bruccoli, A., Pennypacker, K.R., and Harry, G.J. (1999). Effect of dexamethasone on elevated cytokine mRNA levels in chemical-induced hippocampal injury. *J. Neurosci. Res.* 57: 916-926.

Buccinnà, B., Piccinini, M., Prinetti, A., Scandroglio, F., Prioni, S., Valsecchi, M., Votta, B., Grifoni, S., Lupino, E., Ramondetti, C., Schuchman, E.H., Giordana, M.T., Sonnino, S., and Rinaudo, M.T. (2009). Alterations of myelin-specific proteins and sphingolipids characterize the brains of acid sphingomyelinase-deficient mice, an animal model of Niemann-Pick disease type A. *J. Neurochem.* 109, 105-115.

Buchsbaum, R.J. (2007). Rho activation at a glance. *J. Cell. Sci.* 120, 1149-1152.

Bustelo, X.R. (2000). Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1461-1477.

Calabrese, B., Wilson, M.S., and Halpain, S. (2006). Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda)*. 21, 38-47

Camera, P., da Silva, J.S., Griffiths, G., Giuffrida, M.G., Ferrara, L., Schubert, V., Imarisio, S., Silengo, L., Dotti, C.G., and Di Cunto, F. (2003). Citron-N is a neuronal Rho-associated protein involved in Golgi organization through actin cytoskeleton regulation. *Nat. Cell. Biol.* 12, 1071-1078.

Camoletto, P.G., Vara, H., Morando, L., Connell, E., Marletto, F.P., Giustetto, M., Sassoè-Pognetto, M., Van Veldhoven, P.P., and Ledesma, M.D. (2009). Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18. *PLoS ONE* 4, e5310.

Carlisle, H.J., and Kennedy, M.B. (2005). Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends in Neurosci.* 28, 182-187.

Caroni, P. (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 20, 4332-4336.

Carrasco, P., Sahún, I., McDonald, J., Ramírez, S., Jacas, J., and Gratacós, E. (2012). Ceramide levels regulated by carnitine palmitoyltransferase 1C control dendritic spine maturation and cognition. *J. Biol. Chem.* 287, 21224–21232.

Carroll, R.C., Beattie, E.C., Von Zastrow, M., and Malenka, R.C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 315-324.

Chen, C., Tonegawa, S., 1997. Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity –dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 20, 157-184.

Cheng, B., Christakos, S., Mattson, M.P. (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis.

Neuron 12, 139-153.

Cheng, H.-T., and London, E. (2011). Preparation and properties of asymmetric large unilamellar vesicles: interleaflet coupling in asymmetric vesicles is dependent on temperature but not curvature. Biophys. J. 100, 2671-2678.

Cheng, Z.-J., Singh, R.D., Sharma, D.K., Holicky, E.L., Hanada, K., Marks, D.L., and Pagano, R.E. (2006). Distinct mechanisms of clathrin-independent endocytosis have unique sphingolipids requirements. Mol. Biol. Cell. 17, 3197-3210.

Cheng, X., Wang, G., Lee, K.K., and Yang, X. (2014). Dexamethasone Use During Pregnancy: Potential Adverse Effects on Embryonic Skeletogenesis. Curr. Pharm. Des. [Epub ahead of print].

Chiulli, N., Codazzi, F., Di Cesare, A., Gravaghi, C., Zacchetti, D., and Grohovaz, F. (2007). Sphingosylphosphocholine effects on cultured astrocytes reveal mechanisms potentially involved in neurotoxicity in Niemann-Pick type A disease. Eur. J. Neurosci. 26, 875-881.

Choquet, D., and Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. Nat. Rev. Neurosci. 4, 251-265.

Churchward, M.A., Rogasevskaja, T., Höfgen, J., Bau, J., and Coorssen, J.R. (2005). Cholesterol facilitates the native mechanism of Ca²⁺-triggered membrane fusion. J. Cell. Sci. 118, 4833-4848.

Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2006). Neutral sphingomyelinases and nSMase2: binding the gaps. Biochem. Biophys. Acta. 1758, 1893-1901.

Clarke, C.J., Snook, C.F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. Biochemistry. 45, 11247-11256.

Clarke, C.J., Truong, T.G., and Hannun, Y.A. (2007). Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. J. Biol. Chem. 282, 1384-1396.

Cognato, G.P., Agostino, P.M., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Souza, D.O., and Cunha, R.A. (2010). Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J. Neurochem.* 112, 453-462.

Cohen, R.S., Chung, S.K., and Pfaff, D.W. (1985). Immunocytochemical localization of actin in dendritic spines of the cerebral cortex using colloidal gold as a probe. *Cell. Mol. Neurobiol.* 5, 271-284.

Cole, T.J. (2006). Glucocorticoid action and the development of selective glucocorticoid receptor ligands. *Biotechnol Annu Rev* 12: 269 – 300.

Conn, P.J., and Pin, J.P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205-237.

Coorsen, J.R., and Rand, R.P. (1990). Effects of cholesterol on the structural transitions induced by diacylglycerol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayer systems. *Biochem. Cell. Biol.* 68, 65-69.

Cowin, P., and Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 56-65.

Czech, M.P. (2000). Lipid rafts and insulin action. *Nature*, 407, 147-148.

Dale, L.B., Bhattacharya, M., Anborgh, P.H., Murdoch, B., Bhatia, M., Nakanishi, S., and Ferguson, S.S. (2000). G protein-coupled receptor kinase-mediated desensitization of metabotropic glutamate receptor 1A protects against cell death. *J. Biol. Chem.* 275, 38213-38220.

Da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., and Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritogenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* 162, 1267-1279.

De Cassan, C., Fiorino, G., and Danese, S. (2012). Second-generation corticosteroids for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis: more effective and less side effects?. *Dig. Dis.* 30, 368-375.

De Palma, C., Meacci, E., Perrotta, C., Bruni, P., and Clementi, E. (2006). Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 99-105.

De Rubeis, S., Fernández, E., Buzzi, A., Di Marino, D., and Bagni, C. (2012). Molecular and cellular aspects of mental retardation in the Fragile X syndrome: from gene mutation/s to spine dysmorphogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970, 517-551.

Den Hartigh, J.C., Van Bergen en Henegouwen, P.M., Verkleij, A.J., and Boonstra, J. (1992). The EGF receptor is an actin binding protein. *J. Cell. Biol.* 119, 349-355.

Devillard, R., Galvani, S., Thiers, J.C., Guenet, J.L., Hannun, Y., Bielawski, J., Nègre-Salvayre, R., and Augé, N. (2010). Stress-induced sphingolipid signaling: role of type-2 neutral sphingomyelinase in murine cell apoptosis and proliferation. *PLoS One*. 5(3):e9826.

Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D., and Witke, W. (2000). Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J. Cell Sci.* 113, 3795-3803.

Dodge, J.C., Clarke, J., Song, A., Bu, J., Yang, W., Taksir, T.V., Griffiths, D., Zhao, M.A., Schuchman, E.H., Cheng, S.H., O'Riordan, C.R., Shihabuddin, L.S., Passini, M.A., and Stewart, G.R. (2005). Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model of Niemann-Pick type A disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 17822-17827.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454-1468.

Dotti, C.G., Esteban, J.A., and Ledesma, M.D. (2014). Lipid dynamics at dendritic spines. *Front. Neuroanat.* doi: 10.3389/fnana.2014.00076.

El-Husseini, A.E., Schnell, E., Chetkovich, D.M., Nicoll, R.A., and Brecht, D.S. (2000). PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*. 290, 1364-1368.

Ezell, P.C., Papa, L., and Lawson, G.W. (2012). Palatability and treatment efficacy of various ibuprofen formulations in C57BL/6 mice with ulcerative dermatitis. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51, 609-615.

Ferlinz, K., Hurwitz, R., Moczall, H., Lansmann, S., Schuchman, E.H., and Sandhoff, K. (1997). Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 243, 511-517.

Ferlinz, K., Hurwitz, R., Vielhaber, G., Suzuki, K., and Sandhoff, K. (1994). Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *Biochem. J.* 301, 855-862.

Figiel, I. (2008). Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol. Exp.* 68: 526-534.

Filosto, S., Fry, W., Knowlton, A.A., and Goldkorn, T. (2010). Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B). *J. Biol. Chem.* 285, 10213-10222.

Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., Matus, A. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854.

Fowler, S. (1969). Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 191, 481-484.

Francesconi, A., and Duvoisin, R.M. (2000). Opposing effects of protein kinase C and protein kinase A on metabotropic glutamate receptor signaling: selective desensitization of the inositol trisphosphate/Ca²⁺ pathway by phosphorylation of the receptor-G protein-coupling domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6185-6190.

Francesconi, A., Kumari, R., and Zurkin, R.S. (2009). Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the caveolar/lipid raft pathway. *J. Neurosci.* 29, 3590-3602.

Franco-Villanueva, A., Fernández-López, E., Gabandé-Rodríguez, E., Bañón-Rodríguez, I., Esteban, J. A., and Antón, I. M. (2014). WIP modulates dendritic spine actin cytoskeleton by transcriptional control of lipid metabolic enzymes. *Hum. Mol. Genet.* 16, 4383-4395.

Frank, C., Giammarioli, A.M., Pepponi, R., Fiorentini, C., and Rufini, S. (2004). Cholesterol perturbing agents inhibits NMDA-dependent calcium influx in rat hippocampal primary culture. *FEBS Lett.* 566, 25-29.

Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., and D'Arcangelo. (2008). Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 212, 407-414.

Fritz, D., Brouwer, M.C., and van de Beek, D. (2012). Dexamethasone and long-term survival in bacterial meningitis. *Neurology.* 79, 2177-2179.

Fu, Q., Yu, L., Liu, Q., Zhang, J., Zhang, H., and Zhao, S. (2000). Molecular cloning, expression characterization, and mapping of a novel putative inhibitor of rho GTPase activity, RTKN, to D2S145-D2S286. *Genomics.* 66, 328-332.

- Fukazawa**, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Otha, Y., Mizuno, K., and Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*. 38, 447-460.
- Furuyashiki**, T., Arakawa, Y., Takemoto-Kimura, S., Bito, H., and Narumiya, S. (2002). Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14458-14463.
- Gallagher**, S.M., Daly, C.A., Bear, M.F., and Huber, K.M. (2004). Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 24, 4859-4864.
- Galvan**, C., Camoletto, P.G., Cristofani, F., Veldhoven, P.P.V., and Ledesma, M.D. (2008). Anomalous surface distribution of Glycosyl Phosphatidyl Inositol-anchored proteins in neurons lacking Acid Sphingomyelinase. *Mol. Biol. Cell.* 19, 509-522.
- Gault**, C.R., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 1-23.
- Gingras**, D., Gauthier, F., Lamy, S., Desrosiers, R.R., and Béliveau, R. (1998). Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 888-893.
- Goley**, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713-726.
- Gómez-Moutón**, C., Abad, J.L., Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Mañes, S., and Martínez-A, C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *PNAS*. 98, 9642-9647.
- Govek**, E.-E., Newey, S.E., Akerman, C.J., Cross, J.R., Van der Veken, L., and Van Aelst, L. (2004). The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat. Neurosci.* 7, 364-372.
- Govek**, E.-E., Newey, S.E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 19, 1-49.
- Grassme**, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 276, 20589-20596.

Groc, L., Heine, M., Cousins, S.L., Stephenson, F.A., Lounis, B., Cognet, L., and Choquet, D. (2006). NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18769-18774.

Guenzel, F.M., Wolf, O.T., and Schwabe, L. (2014). Glucocorticoids boost stimulus-response memory formation in humans. *Psychoneuroendocrinology.* 45, 21-30.

Gulbins, E., and Kolesnik, R. (2003). Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene.* 22, 7070-7077.

Gupta, A.K., and Rudney, H. (1991). Plasma membrane sphingomyelin and the regulation of HMG-CoA reductase activity and cholesterol biosynthesis in cell cultures. *J. Lipid Res.* 32, 125-136.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279, 509-514.

Haque, M.E., McIntosh, T.J., and Lentz, B.R. (2001). Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: “nature’s own” fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* 40, 4340-4348.

Harris, K.M., and Kater S.B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 17, 341-371.

Harris, K.M., and Stevens, J.K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* 9, 2982-2997.

Hashimoto, R., Nakamura, Y., Kosako, H., Amano, M., Kaibuchi, K., Inagaki, M., and Takeda, M. (1999). Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 575-579.

Heine, M., Thoumine, O., Mondin, M., Tessier, B., Giannone, G., and Choquet, D. (2008). Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroligin contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20947-20952.

Heise, H., Bayerl, T., Isenberg, G., and Sackman, E. (1991). Human platelet P-235, a talin-like actin binding protein, binds selectively to mixed lipids bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1061, 121-131.

Heiska, L., Alfthan, K., Grönholm, M., Vilja, P., Vaheri, A., and Carpén, O. (1998). Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2).

Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 21893-21900.

Hering, H., Lin, C.-C., and Sheng, M. (2003). Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J. Neurosci.* 23, 3262-3271.

Hirao, M., Sato, N., Kondo, T., Yonemura, S., Monden, M., Sasaki, T., Takai, Y., and Tsukita, S. (1996). Regulations mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J. Cell Biol.* 135, 37-51.

Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 150, 1311-1320.

Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., and Narumiya, S. (1998). Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Cell. Biol.* 141, 1625-1636.

Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5895-5900.

Hojati, M.R., and Jiang, X.C. (2006). Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 47, 673-676.

Holick, M.F. (2005). A fluorescent glycolipid-binding peptide probe traces cholesterol dependent microdomain-derived trafficking pathways. *South Med J* 98: 1024 – 1027.

Holt, M.R., and Koffer, A. (2001). Cell motility: proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol.* 11, 38-46.

Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647-658.

Hong, S.Y., Jeon, Y.M., Lee, H.J., Kim, J.G., Baek, J.A., and Lee, J.C. (2010). Activation of RhoA and FAK induces ERK-mediated osteopontin expression in mechanical force-subjected periodontal ligament fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* 335, 263-272.

Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai H. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719-729.

Hooper, N.M. (1999). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). *Mol. Membr. Biol.* 16, 145-156.

Hori, Y., Kikuchi, A., Isomura, M., Katayama, M., Miura, Y., Fujioka, H., Kaibuchi, K., and Takai, T. (1991). Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins. *Oncogene*. 6, 515-522.

Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D.P., Ferlinz, K., Bisgaier, C.L., Sandhoff, K., Desnick, R.J., Stewart, C.L., and Schuchman, E.H. (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat. Genet.* 10, 288-293.

Horne, E. A., and Dell'Acqua, M. L. (2007). Phospholipase C is required for changes in postsynaptic structure and function associated with NMDA receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* 27, 3523-3534.

Huitema, K., van den Dikkenberg, J., Brouwers, J.F., and Holthuis, J.C. (2004). Identification of a family of animal sphingomyelin synthases. *EMBO J.* 23, 33-44.

Huttner, W.B., and Schmidt, A. (2000). Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 543-551.

Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., Hakosima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* 273, 9656-9666.

Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., and Takenawa, T. (2001). Role of the ENTH Domain in Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Binding and Endocytosis. *Science*. 291, 1047-1051.

Jafari, M., Seese, R.R., Babayan, A.H., Gall, C.M., and Lauterborn, J.C. (2012). Glucocorticoid receptors are localized to dendritic spines and influence local actin signaling. *Mol Neurobiol* 46: 304 – 315

Jeckel, D., Karrenbauer, A., Birk, R., Schmidt, R.R., and Wieland, F. (1990). Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett.* 261, 155-157.

Jeon, H.J., Lee, D.H., Kang, M.S., Lee, M.O., Jung, S.Y., and Kim, D.K. (2005). Dopa-

mine release in PC12 cells is mediated by Ca(2+)-dependent production of ceramide via sphingomyelin pathway. *J. Neurochem.* 3, 811-820.

Jin, H.K., Carter, J.E., Huntley, G.W., and Schuchman, E.H. (2002). Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J. Clin. Invest.* 109, 1183-1191.

Jo, Y., and Debose-Boyd, R.A. (2010). Control of cholesterol synthesis through regulated ER-associated degradation of HMG CoA reductase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45, 185-198.

Kaech, S., and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 1, 2406-2415.

Kammermeier, P.J., and Worley, P.F. (2007). Homer 1a uncouples metabotropic glutamate receptor 5 from postsynaptic effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 6055-6060.

Kanwar, A.J., Mahajan, R., and Parsad, D. (2013). Low-dose oral mini-pulse dexamethasone therapy in progressive unstable vitiligo. *J. Cutan. Med. Surg.* 17, 259-268.

Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360-368.

Kaufmann, W.E., Moser, H.W. 2000. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb. Cortex.* 10, 981-991.

Kawamura, S., Miyamoto, S., and Brown, J.H. (2003). Initiation and transduction of stretch-induced RhoA and Rac1 activation through caveolae: cytoskeletal regulation of ERK translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 31111-31117.

Koch, C., and Zador, A.K. (2008). The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neurosci.* 13, 413-422.

Korade, Z., and Kenworthy, A.K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology.* 55, 1265-1273.

Kiyokawa, E., Makino, A., Ishii, K., Otsuka, N., Yamaji-Hasegawa, A., and Kobayashi, T. (2004). Recognition of sphingomyelin by lysenin and lysenin-related proteins. *Biochemistry.* 43, 9766-9773.

Kotani, H., Takaishi, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1997). Rho regulates association of both the ERM family and vinculin with the plasma membrane in MDCK cells. *Oncogene* 14, 1705-1713.

Kozma, R., Sarner, S., Ahmed, S., and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1201-1211.

Kumari, R., Castillo, C., and Francesconi, A. (2013). Agonist-dependent signaling by group I metabotropic glutamate receptors is regulated by association with lipid domains. *J. Biol. Chem.* 288, 32004-32019.

Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K., and Okabe, S. (2006). Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J. Neurosci.* 26, 7693-7706.

Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J., and Fujiwara, T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34, 351-378.

Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* 27, 982-992.

Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., and Berns, A. (1985). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 13, 4293-4298.
Lassing, I., and Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate and profilactin. *Nature*, 314, 472-474.

Ledesma, M.D., Simons, K., and Dotti, C.G. (1998). Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3966-3971.

Lentz, B.R., Carpenter, T.J., and Alford, D.R. (1987). Spontaneous fusion of phosphatidylcholine small unilamellar vesicles in the fluid phase. *Biochemistry*. 26, 5389-5397.

Lesiak, A., Pelz, C., Ando, H., Zhu, M., Davare, M., Lambert, T.J., Hansen, K.F., Obrietan, K., Appleyard, S.M., Impey, S., and Wayman, G.A. (2013). A genome-wide screen of CREB occupancy identifies the RhoA inhibitors Par6C and Rnd3 as regulators of BDNF-induced synaptogenesis. *PLoS One*, 8(6): e64658.

- Leung**, T., Manser, E., Tan, L., and Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* 270, 29051-29054.
- Levental**, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, U., and Simons, K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 21, 22050-22054.
- Levrán**, O., Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (1991). Niemann-Pick type B disease. Identification of a single codon deletion in the acidsphingomyelinase gene and genotype/phenotype correlations in type A and B patients. *J. Clin. Invest.* 88, 806-810.
- Li**, N., Mak, A., Richards, D.P., Naber, C., Keller, B.O., Li, L., and Shaw, A.R.E. (2003). Monocyte lipid rafts contain proteins implicates in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics.* 3, 536-548.
- Liang**, X., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Bornmann, W., Tempst, P., and Resh, M.D. (2001). Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276, 30987-30994.
- Lin**, B., Kramár, E.A., Bi, X., Brucher, F.A., Gall, C.M., and Lynch, G. (2005). Thea stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J. Neurosci.* 25, 2062-2069.
- Linetti**, A., Fratangeli, A., Taverna, E., Valnegri, P., Francolini, M., Cappello, V., Matteoli, M., Passafaro, M., and Rosa, P. (2010). Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J. Cell. Sci.* 123, 595-605.
- Liposits**, Z., and Bohn, M.C. (1993). Association of glucocorticoid receptor immunoreactivity with cell membrane and transport vesicles in hippocampal and hypothalamic neurons of the rat. *J. Neurosci. Res.* 35, 14-19.
- London**, E. (2005). How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1746, 203-220.
- Luján**, R., Roberts, J.D., Shigemoto, R., Ohishi, H., and Somogyi, P. (1997). Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J. Chem. Neuroanat.* 13, 219-241.
- Luo**, L. (2000). Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 173-180

Luo, L. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18, 601-635.

Luo, L., Hensch, T.K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* 379, 837-840.

Macauley, S.L., Sidman, R.L., Schuchman, E.H., Taksir, T., and Stewart, G.R. (2008). Neuropathology of the acid sphingomyelinase knockout mouse model of Niemann-Pick A disease including structure-function studies associated with cerebellar Purkinje cell degeneration. *Exp. Neurol.* 214, 181-192.

Madaule, P., Furuyashiki, T., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Morii, N., and Narumiya, S. (1995). A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS Lett.* 377, 243-248.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 285, 895-898.

Magee, A.I. (1998). Post-translational processing of ras proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 17, 875-876.

Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M. (1999). ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 9, 187-192.

Mao, L., Yang, L., Tang, Q., Samdani, S., Zhang, G., and Wang, J.Q. (2005). The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J. Neurosci.* 25, 2741-2752.

Mao, L.M., Zhang, G.C., Liu, X.Y., Fibuch, E.E., and Wang, J.Q. (2008). Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene expression in striatal neurons. *Neurochem. Res.* 33, 1920-1924.

Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2004). Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell. Biol.* 82, 27-44.

Marchesini, N., Luberto, C., and Hannun, Y.A. (2003). Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 13775-13783.

Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block,

M.R., and Albiges-Rizo, C. (2001). Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 276, 21217-21227.

Martin, M.G., Ahmed, T., Korovaichuk, A., Venero, C., Menchón, S.A., and Salas, I. (2014). Constitutive hippocampal cholesterol loss underlies poor cognition in old rodents. *EMBO Mol. Med.* 30, 902–917.

Martin, S.J., Grimwood, P.D., Morris, R.G.M., 2000. Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Ann. Rev. Neurosci.* 23, 649-711.
Masland, R.H. (2004). Neuronal cell types. *Curr Biol* 14, R497-500.

Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15, 2208-2216.

Matsuzaki, M., 2007. Factors critical for the plasticity of dendritic spines and memory storage. *Neurosci. Res.* 57, 1-9.

Matus, A. (2005). Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 67-72.

Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H.R., and Fujiwara, K. (1982). High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7590–7594.

McKinney, R.A. (2010). Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J. Physiol.* 588, 107-116.

Milhas, D., Clarke, C.J., Idkowiak-Baldys, J., Canals, D., and Hannun, Y.A. (2010). Anterograde and retrograde transport of neutral sphingomyelinase-2 between the Golgi and the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 12, 1361-1374.

Miranda, S.R., Erlich, S., Friedrich, V.L. Jr., Gatt, S., and Schuchmann, E.H. (2000). Hematopoietic stem cell gene therapy leads to marked visceral organ improvements and a delayed onset of neurological abnormalities in the acid sphingomyelinase deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Gene Ther.* 20, 1768-1776.

Miyachi, Y. (2000). Pathophysiology and diagnosis of Cushing's syndrome. *Biomed. Pharmacother.* 54 Suppl 1:113s-117s.

Murakoshi, H., Wang, H., and Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*. 472, 100-104.

Neuhoff, H., Sassoè-Pognetto, M., Panzanelli, P., Maas, C., Witke, W., and Kneusel, M. (2005). The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur. J. Neurosci*. 21, 15-25.

Newman, C.M., and Magee, A.I. (1993). Posttranslational processing of the ras superfamily of small GTP-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1155, 79-96.

Nichols, B.J., and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. 11, 406-412.

Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., and Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu. Rev. Physiol*. 64, 313-353.

Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R. and Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron* 46, 609-622.

Norman, E., Cutler, R.G., Flannery, R., Wang, Y., and Mattson, M.P. (2010). Plasma membrane sphingomyelin hydrolysis increases hippocampal neuron excitability by sphingosine-1-phosphate mediated mechanisms. *J. Neurochem*. 114, 430-439.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol*. 132, 1033-1044.

Ogawa, T., Hirose, Y., Ohara, S., Ono, T., and Watanabe, Y. (1985). A simple quantitative bradykinin test in MPTP-treated mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*. 50, 435-441.

Okamoto, Y., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2002). Bcl-xL interrupts oxidative activation of neutral sphingomyelinase. *FEBS Lett*. 530, 104-108.

Okazaki, T., Bielawska, A., Domae, N., Bell, R.M., and Hannun, Y.A. (1994). Characteristics and partial purification of a novel cytosolic, magnesium-independent, neutral sphingomyelinase activated in the early signal transduction of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-induced HL-60 cell differentiation. *J. Biol. Chem*. 269, 4070-4077.

Okazaki, T., Bell, R.M., and Hannun, Y.A. (1989). Sphingomyelin turnover induced by vitamin D₃ in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem*. 264, 19076-19080.

Otterbach, B., and Stoffel, W. (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell*. 81, 1053-1061.

Palazzo, A.F., Eng, C.H., Schlaepfer, D.D., Marcantonio, E.E., and Gundersen, G.G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*. 303, 836-839.

Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*. 75, 1007-1014.

Pardridge WM, Sakiyama R, Coty WA (1985) Restricted transport of vitamin D and A derivatives through the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 44: 1138 – 1141.

Parton, R.G., and Richards, A.A. (2003). Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*. 4, 724-738.

Passini, M.A., Macauley, S.L., Huff, M.R., Taksir, T.V., Bu, J., Wu, I.H., Piepenhagen, P.A., Dodge, J.C., Shihabuddin, L.S., O’Riordan, C.S., Schuchman, E.H., and Stewart, G.R. (2005). AAV vector-mediated correction of brain pathology in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *Mol. Ther.* 11, 754-762.

Pavalko, F.M., Otey, C.A., Simon, K.O., and Burridge, K. (1991). Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 1065-1069.

Peavy, R.D., and Conn, P.J. (1998). Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in cultured rat cortical glia by stimulation of metabotropic glutamate receptors. *J. Neurochem.* 71, 603-612.

Perrota, C., Bizzozero, L., Cazzato, D., Morlacchi, S., Assi, E., Simbari, F., Zhang, Y., Gulbins, E., Bassi, M.T., Rosa, P., and Clementi, E. (2010). Syntaxin 4 is required for acid sphingomyelinase activity and apoptotic function. *J. Biol. Chem.* 285, 40240-40251.

Pilo Boyl, P., Di Nardo, A., Mulle, C., Sassoè-Pognetto, M., Panzanelli, P., Mele, A., Kneussel, M., Constantini, V., Perlas, E., Massimi M., Vara, H., Giustetto, M., and Witke, W. (2007). Profilin2 contributes to synaptic vesicle exocytosis, neuronal excitability, and novelty-seeking behavior. *EMBO J.* 26, 2991-3000.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Pontier, S.M., Percherancier, Y., Galandrin, S., Breit, A., Galés, C., and Bouvier, M. (2008). Cholesterol-dependent separation of the beta2-adrenergic receptor from its partners determines signaling efficacy: insight into nanoscale organization of signal transduction. *J. Biol. Chem.* 36, 24659-24672.

Posse de Chaves, E., and Spione, S. (2010). Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett.* 9, 1748-59.

del Pozo, M.A., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Chiang, H.H., Anderson, R.G., and Schwartz, M.A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science.* 303, 839-842.

Prag, S., Parsons, M., Keppler, M.D., Ameer-Beg, S.M., Barber, P., Hunt, J., Beavil, A., J., Calvert, R., Arpin, M., and Vojnovic, B. (2007). Activated ezrin promotes cell migration through recruitment of the GEF Dbl to lipid rafts and preferential downstream activation of Cdc42. *Mol. Biol. Cell* 18, 2935-2948.

Ramachandran, C.K., Murray, D.K., and Nelson, D.H. (1990). Dexamethasone increases neutral sphingomyelinase activity and sphingosine levels in 3T3-L1 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167, 607-613.

Rao, B.G., and Spence, M.W. (1976). Sphingomyelinase activity at pH 7.4 in human brain and a comparison to activity at pH 5.0. *J. Lipid Res.* 17, 506-515.

Ratman, D., Vanden Berghe, W., Dejager, L., Libert, C., Tavernier, J., Beck, I.M., and De Bosscher, K. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol. Cell Endocrinol.* 380, 41-54.

Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Ma-daule, P., and Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem.* 23, 13556-13560.

Renner, M., Choquet, D., and Triller, A. (2009). Control of the postsynaptic membrane viscosity. *J. Neurosci.* 29, 2926-2937.

Rex, C.S., Chen, L.Y., Sharma, A., Liu, J., Babayan, A.H., Gall, G.M., and Lynch, G. (2009). Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *J. Cell. Biol.* 186, 85-97.

Richards, D.A., De Paola, V., Caroni, P., Gähwiler, B.H., and McKinney, R.A. (2004). AMPA-receptor activation regulates the diffusion of a membrane marker in parallel with dendritic spine motility in the mouse hippocampus. *J. Physiol.* 558, 503-512.

Riento, K., and Ridley, A.J. (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446-456.

Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs B., and Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol. Biol. Cell.* 10, 961-974.

Rogasevskia, T., and Coorssen, J.R. (2006). Sphingomyelin-enriched microdomains define the efficiency of native Ca(2+)-triggered membrane fusion. *J. Cell. Sci.* 119, 2688-2694.

Romeo, R.D., Waters, E.M., and McEwen, B.S. (2004). Steroid-induced hippocampal synaptic plasticity: sex differences and similarities. *Neuron Glia Biol.* 3, 219-229.

Ronesi, J.A., and Huber, K.M. (2008). Metabotropic glutamate receptors and fragile x mental retardation protein: partners in translational regulation at the synapse. *Sci. Signal.* 1, 5-6.

Rozelle, A.L., Machesky, L.M., Yamamoto, M., Driessens, M.H., Insall, R.H., Roth, M.G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H.L. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr. Biol.* 10, 311-320.

Ruchhoeft, M.L., Ohnuma, S., McNeill, L., Holt, C.E., and Harris, W.A. (1999). The neuronal architecture of *Xenopus* retinal ganglion cells is sculpted by rho-family GTPases in vivo. *J. Neurosci.* 19, 8454-8463.

Salaün, C., Gould, G.W., and Chamberlain, L.H. (2005). Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19449-19453.

Sapolsky, R.M. (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. *Exp Gerontol* 34, 721-732.

Sarna, J., Miranda, S.R., Schuchman, E.H., and Hawkes, R. (2001). Patterned cerebellar Purkinje cell death in a transgenic mouse model of Niemann Pick type A/B disease. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1873-1880.

Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., and Hannun, Y.A. (1999). Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 274, 38131-38139.

Scandroglio, F., Venkata, J.K., Loberto, N., Prioni, S., Schuchman, E.H., Chigorno, V., Prinetti, A., and Sonnino, S. (2008). Lipid content of brain, brain membrane lipid domains, .

and neurons from acid sphingomyelinase deficient mice. *J. Neurochem*, 107, 329-338.

Scheiffele, P., Roth, M.G., and Simons, K. (1997). Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 16, 5501-5508.

Schissel, S.L., Keesler, G.A., Schuchman, E.H., Williams, K.J., and Tabas, I. (1998). The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J. Biol. Chem.* 273, 18250-18259.

Schissel, S.L., Schuchman, E.H., Williams, K.J., and Tabas, I. (1996). Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J. Biol. Chem.* 271, 18431-18436.

Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 16, 1587-1609.

Schoepp, D.D., Goldsworthy, J., Johnson, B.G., Salhoff, C.R., and Baker, S.R. 3,5-dihydroxyphenylglycine is a highly selective agonist for phosphoinositide-linked metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *J. Neurochem.* 63, 769-772.

Schuchman, E.H. (2007). The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30, 654-663.

Schuchman EH (2009) The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47 (Suppl. 1): S48 – S57.

Schuchman, E.H. (2010). Acid sphingomyelinase, cell membranes and human disease: lessons from Niemann-Pick disease. *FEBS Lett.* 584, 1895-1900.

Schubert, V., Da Silva, J.S., and Dotti, C.G. (2006). Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J. Cell Biol.* 172, 453-467.

Schwarz, A., Rapaport, E., Hirschberg, K., and Futerman, A.H. (1995). A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J. Biol. Chem.* 18, 10990-10998.

Sheng, M., and Lee, S.H., (2001). AMPA receptor trafficking and the control of synaptic transmission. *Cell.* 105, 825-828.

Shihabuddin, L.S., Numan, S., Huff, M.R., Dodge, J.C., Clarke, J., Macauley, S.L., Yang, W., Taksir, T.V., Parsons, G., Passini, M.A., Cage, F.H., and Stewart, G.R. (2004). Intracerebral transplantation of adult mouse neural progenitor cells into the Niemann-Pick-A mouse leads to a marked decrease in lysosomal storage pathology. *J. Neurosci.* 24, 10642-10651.

Simonaro, C.M., Park, J.H., Eliyahu, E., Shtraizent, N., McGovern, M.M., and Schuchman, E.M. (2006). Imprinting at the SMPD1 locus: implications for acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 865-870.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387, 569-572.

Simons, K., and Sampaio, J.L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10, a004697.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.

Sitrin, R.G., Sassanella, T.M., and Petty, H.R. (2011). An obligate role for membrane-associated neutral sphingomyelinase activity in orienting chemotactic migration of human neutrophils. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 44, 205-212.

Smith, E.L., and Schuchman, E.H. (2008). The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J.* 10, 3419-3431.

Sodero, A.O., Weissmann, C., Ledesma, M.D., and Dotti, C.G. (2011). Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol. Aging.* 32, 1043-1053.

Solski, P.A., Helms, W., Keely, P.J., Su, L., and Der, C.J. (2002). RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ.* 13, 363-373.

Spence, M.W., Byers, D.M., Palmer, F.B., and Cook, H.W. (1989). A new Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum. *J. Biol. Chem.* 264, 5358-5363.

Staffend, N.A., and Meisel, R.L. (2011). DiOlistic labeling in fixed brain slices: phenotype, morphology, and dendritic spines. *Curr. Protoc. Neurosci.* Ch. 2: Unit 2.13.

Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., and Murthy, V.N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat. Neurosci.* 5, 239-246.

Steinert S, Lee E, Tresset G, Zhang D, Hortsch R, Wetzel R, Hebbar S, Sundram JR, Kesavapany S, Boschke E et al (2008) A fluorescent glycolipid-binding peptide probe traces cholesterol dependent microdomain-derived trafficking pathways. *PLoS ONE* 3: e2933.

Stoffel, W. (1999). Functional analysis of acid and neutral sphingomyelinases in vitro and in vivo. *Chem. Phys. Lipids.* 102, 107-121.

Stoffel, W., Jenke, B., Blöck, B., Zumbansen, M., and Koebe, J. (2005). Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4554-4559.

Stokoe, D., Macdonald, S.G., Cadwallader, K., Symons, M., Hancock, J.F. (1994). Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*, 264, 1463-1467.

Stumpf, W.E., Heiss, C., Sar, M., Duncan, G.E., and Craver, C. (1989). Dexamethasone and corticosterone receptor sites. Differential topographic distribution in rat hippocampus revealed by high resolution autoradiography. *Histochemistry.* 92, 201-210.

Stumpf, W.E. (2012). Drugs in the brain--cellular imaging with receptor microscopic autoradiography. *Prog. Histochem. Cytochem.* 47, 1-26.

Subtil, A., Gaidarov, I., Kobylarz, K., Lampson, M.A., Keen, J.H., and McGraw, T.E. (1999). Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 12, 6775-6780.

Sugiura, Y., Shimma, S., Konishi, Y., Yamada, M.K., and Setou, M. (2008). Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS ONE* 3, e3232.

Suzuki, T., Zhang, J., Miyazawa, S., Liu, Q., Farzan, M.R., and Yao, W.-D. (2011). Association of membrane rafts and postsynaptic density: proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *J. Neurochem.* 119, 64-77.

Tabatadze, N., Savonenko, A., Song, H., Bandaru, V.V., Chu, M., and Haughey, N.J. (2010). Inhibition of neutral sphingomyelinase-2 perturbs brain sphingolipid balance and spatial memory in mice. *J. Neurosci. Res.* 88, 2940-2951.

Tada, T., and Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 95-101.

Tafesse, F.G., Huitema, K., Hermansson, M., van der Poel, S., van den Dikkenberg, J., Uphoff, A., Somerharju, P., and Holthuis, J.C. (2007). Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 282, 17537-17547.

Tafesse, F.G., Ternes, P., and Holthuis, J.C. (2006). The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* 40, 29421-29425.

Takaishi, K., Mino, A., Ikeda, W., Nakano, K., and Takai, Y. (2000). Mechanisms of activation and action of mDial in the formation of parallel stress fibers in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 68-72.

Takahashi, K., Sasaki, T., Mammoto, A., Takaishi, K., Kameyama, T., Tsukita, S., and Takai, Y. (1997). Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J. Biol. Chem.* 272, 23371-23375.

Tani, M., and Hannun, Y.A. (2007). Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues. Role of palmitoylation in subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 282, 10047-10056.

Tashiro, A., Minden, A., and Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex* 10, 927-938.

Tcherkasova, A.E., Adam-Klages, S., Kruse, M.L., Wiegmann, K., Mathieu, S., Kolanus, W., Krönke, M., and Adam, M. (2002). Interaction with factor associated with neutral sphingomyelinase activation, a WD motif-containing protein, identifies receptor for activated C-kinase 1 as a novel component of the signaling pathways of the p55 TNF receptor. *J. Immunol.* 169, 5161-5170.

Testai, F.D., Landek, M.A., Goswami, R., Ahmed, M., and Dawson, G. (2004). Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myoinositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling. *J. Neurochem.* 89, 636-644.

Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A.C., and Aderem, A. (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature*, 351, 320-322.

Thivierge, J.P. (2008). Neural diversity creates a rich repertoire of brain activity. *Commun Integr Biol* 1, 188-189.

Threadgill, R., Bobb, K., and Ghosh, A. (1997). Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron* 19, 625-634.

Todd, P.K., Malter, J.S., and Mack, K.J. (2003). Whisker stimulation-dependent translation of FMRP in the barrel cortex requires activation of type I metabotropic glutamate receptors. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* 110, 267-278.

Toonen, R.F., and Verhage, M. (2007). Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends. Neurosci.* 11, 564-572.

Topinka, J.R., and Bredt, D.S. (1998). N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4. *Neuron* 20, 125-134.

Tseng, Y., and Wirtz, D. (2004). Dendritic branching and homogenization of actin networks mediated by arp2/3 complex. *Phys. Rev. Lett.* 93, 258104.

Turner, C. E. (2000). Paxillin interactions. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 23. 4139-4140.

Tyteca, D., D'Auria, L., Der Smissen, P.V., Medts, T., Carpentier, S., Monbaliu, J.C., de Diesbach, P., and Courtoy, P.J. (2010). Three unrelated sphingomyelin analogs spontaneously cluster into plasma membrane micrometric domains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1798, 909-927.

Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.

Vandekerckhove, J., Deboen, A., Nassal, M., and Wieland, T. (1985). The phalloidin binding site of F-actin. *EMBO J.* 4, 2815-2818.

Vaughan, E.M., Miller, A.L., Yu, H.Y.E., and Bement, W.M. (2011). Control of local Rho GTPase crosstalk by Abr. *Curr. Biol.* 21, 270-277.

Veldman, R.J., Maestre, N., Aduib, O.M., Medin, J.A., Salvayre, R., and Levade, T. (2001). A neutral sphingomyelinase resides in sphingolipid-enriched microdomains and is inhibited by the caveolin-scaffolding domain: potential implications in tumour necrosis factor signalling. *Biochem. J.* 355, 859-868.

Waung, M.W., Pfeiffer, B.E., Nosyreva, E.D., Ronesi, J.A., and Huber, K.M. (2008). Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron.* 59, 84-97.

Wessel, D., and Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143.

Wheeler, D., Knapp, E., Bandaru, V.V.R., Wang, Y., Knorr, D., Poirier, C., Mattson, M.P., Geiger, J.D., and Haughey, N.J. (2009). Tumor necrosis factor- α -induced neutral sphingomyelinase-2 modulates synaptic plasticity by controlling the membrane insertion of NMDA receptors. *J. Neurochem.* 109, 1237-1249.

Wilckens, T. (1995). Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 193 – 197.

Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol.* 14, 461-469.

Witke, W., Podtelejnikov, A.D., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C., and Mann, M. (1998). In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J.* 17, 967-976.

Witke, W., Sutherland, J.D., Sharpe, A., Arai, M., and Kwiatkowski, D.J. (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3832-3836.

Wróbel, A., Serefko, A., Wlaz, P., and Poleszak, E. (2014). The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 54, 243-248.

Wu, B.X., Rajagolapan, V., Roddy, P.L., Clarke, C.J., and Hannun, Y.A. (2010). Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J. Biol. Chem.* 285, 17993-18002.

Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H., and Umeda, M. (1998). Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.* 273, 5300-5306.

Yamashita, T., Tucker, K.L., and Barde, Y.A. (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron*, 24, 585-593.

Yamazaki, M., Fukaya, M., Abe, M., Ikeno, K., Kakizaki, T., Watanabe, M., and Sakimura, K. (2001). Differential palmitoylation of two mouse glutamate receptor interacting protein 1 forms with different N-terminal sequences. *Neurosci. Lett.* 304, 81-84.

Yuste, R., Bonhoeffer, T., 2001. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1071-1089.

Yuste, R., and Denk, W. (1995). Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375, 682-684.

Yuste, R., Tank, DW., 1996. Dendritic Integration in Mammalian Neurons, a Century after Cajal. *Neuron* 16, 701-716.

Zeidan, Y.H., and Hannun, Y.A. (2007). Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 282, 11549-11561.

Zeidan, Y.H., Jenkins, R.W., and Hannun, Y.A. (2008). Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J. Cell. Biol.* 181, 335-350.

Zeng, C., Lee, J.T., Chen, H., Chen, S., Hsu, C.Y., and Xu, J. (2005). Amyloid-beta peptide enhances tumor necrosis factor-alpha-induced iNOS through neutral sphingomyelinase/ceramide pathway in oligodendrocytes. *J. Neurochem.* 94, 703-712.

Zhang, S.X., Bondada, V., and Geddes, J.W. (2003). Evaluation of conditions for calpain inhibition in the rat spinal cord: effective postinjury inhibition with intraspinal MDL28170 microinjection. *J. Neurotrauma* 20, 59-67.

Ziegler, W.H., Gingras, A.R., Critchley, D.R., and Emsley, J. (2008). Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 235-239.

ANEXO

